

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**MECANISMOS DE RESISTENCIA Y PERFIL DE EXPRESION DE GENES  
INVOLUCRADOS EN LA RESISTENCIA A LA DELTAMETRINA EN  
POBLACIONES DE *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) EN MÉXICO**

Por

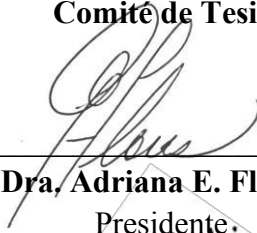
**YAMILI JAZMIN CONTRERAS PERERA**

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
**DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACION EN ENTOMOLOGIA MEDICA**

Octubre, 2020

MECANISMOS DE RESISTENCIA Y PERFIL DE EXPRESION DE GENES  
INVOLUCRADOS EN LA RESISTENCIA A LA DELTAMETRINA EN  
POBLACIONES DE *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) EN MÉXICO

**Comité de Tesis**



---

**Dra. Adriana E. Flores Suárez**  
Presidente.




---

**Dra. Beatriz López Monroy**  
Secretario




---

**Dr. Gustavo Ponce García**  
Vocal



---

**Dra. Susana Favela Lara**  
Vocal



---

**Dr. Humberto Quiróz Martínez**  
Vocal

MECANISMOS DE RESISTENCIA Y PERFIL DE EXPRESION DE GENES  
INVOLUCRADOS EN LA RESISTENCIA A LA DELTAMETRINA EN  
POBLACIONES DE *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) EN MÉXICO

**DIRECTOR DE TESIS**



---

**Dra. Adriana E. Flores Suarez**  
Directora



---

**Dr. Pablo C. Manrique Saide**  
Director externo

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT): (CVU/Becario: 631803/331667).

Dra. Adriana E. Flores por su disposición, dirección, paciencia y valioso tiempo que brindo para la realización de este trabajo, por sus enseñanzas y consejos.

A UANL y staff laboratorio de Fisiología y Toxicología de Insectos, por las facilidades proporcionadas para realizar mis experimentos.

Dr. Pablo C. Manrique Saide por su apoyo, confianza, consejos y motivación.

Al equipo de campo UCBE- UADY por su apoyo en las colectas entomológicas.

Dra. Maria C. Bobadilla Utrera por el material biológico proporcionado.

Dra Audrey Lenhart y el staff del Laboratorio de Enfermedades Parasitarias y Malaria del (CDC) de Atlanta, EE. UU, por el financiamiento brindado para la estancia y realización de mis experimentos.

Iram Rodríguez y Daniel Saldaña por su ayuda con los análisis bioinformáticos.

Comite de tesis por sus comentarios, sugerencias y evaluaciones tutoriales.

A todas las persons que de alguna forma estuvieron conmigo y contribuyeron a la realización de este trabajo.

A todos ustedes muchas gracias.

## **DEDICTORIA**

A mi HIJO, mi privilegio, mi excusa, mi motivo, mi motor, mi fuerza.

A mi ANGEL, mi motivador, mi amigo, mi confidente.

A mi FAMILIA, Padres, hermanos y sobrinos por creer en mí y enviarme  
siempre sus mejores deseos.

A mis AMIGOS

AL UNIVERSO por conspirar a mi favor para culminar esta meta  
profesional.

# ÍNDICE

Sección	Página
RESUMEN.....	i
ABSTRACT.....	ii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	2
2.1 <i>Aedes aegypti</i> (Lineanus, 1762).....	3
2.2 Importancia como vector.....	3
2.3 Control.....	4
2.3.1 Insecticidas piretroides.....	6
2.3.2 Deltametrina.....	7
2.4 Resistencia.....	7
2.4.1 Mecanismos de resistencia.....	8
2.4.2 Resistencia por insensibilidad en el sitio de destino.....	9
2.4.3 Resistencia Metabólica.....	10
2.4.3.1 Genes de desintoxicación.....	14
2.4.5 Otros genes de resistencia.....	16
2.4.6 Resistencia cuticular.....	16
3. JUSTIFICACIÓN.....	17
4. HIPOTEISS.....	18
5. OBJETIVOS.....	19
5.1 Objetivo general.....	19
5.2 Objetivos particulares.....	19
6. MATERIALES Y METODOS.....	20
6.1 Origen de las poblaciones bajo estudio.....	20
6.2 Manejo y establecimiento de las poblaciones de <i>Aedes aegypti</i> .....	22
6.2.1 Cepa de referencia.....	22

6.2.2 Establecimiento de las poblaciones bajo estudio.....	22
6.3 Insecticida.....	22
6.4 Bioensayos por el método de botellas del CDC.....	23
6.5 Nivel de resistencia cepa de campo y cepa susceptible.....	24
6.6 Selección.....	24
6.7 Análisis de heredabilidad.....	25
6.8 Pruebas moleculares para determinar la frecuencia de las mutaciones V410L, V1016I y F1534C.....	26
6.8.1 Extracción de ADN.....	26
6.8.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	27
6.9 Ensayos bioquímicos.....	28
6.9.1 Esterasas alfa y beta ( $\alpha$ y $\beta$ -EST).....	29
6.9.2 Oxidasas de función múltiple (MFO).....	29
6.9.3 Glutation S-transferasas (GST).....	30
6.9.4 Acetil colinesterasa (AChE) y acetil colinesterasa insensible (iAChE).....	30
6.9.5 Cuantificación de proteínas totales (PTN).....	30
6.10 Curvas de calibración.....	31
6.10.1 Esterasas alfa y beta ( $\alpha$ y $\beta$ -EST).....	31
6.10.2 Oxidasas de función múltiple (MFO).....	31
6.10.3 Proteínas totales (PTN).....	31
6.11 Corrección de los valores medios de absorbancia y su transformación en actividad enzimática.....	31
6.11.1 Esterasas alfa y beta ( $\alpha$ y $\beta$ -EST).....	32
6.11.2 Oxidasas de función múltiple (MFO).....	32
6.11.3 Glutation S-transferasas (GST).....	32
6.11.4 Acetilcolinesterasa (AChE).....	33
6.11.5 Proteínas totales (PTN).....	33
6.11.6 Análisis estadístico.....	33
6.12 RNA-seq.....	34

6.12.1 Extracción total de RNA.....	34
6.12.2 Cuantificación del RNA total.....	35
6.12.3 Purificación del RNA.....	35
6.12.4 Eliminación de RNAr.....	35
6.12.5 Preparación de las librerías.....	37
6.12.6 Purificación de la librería de RNA.....	38
6.13 Análisis de expresión diferencial.....	38
6.13.1 Anotación de genes.....	38
6.13.2 Normalización.....	39
6.13.3 Análisis estadístico de la expresión diferencial.....	39
6.13.4 Descripción de funciones ontológicas.....	39
7. RESULTADOS.....	41
7.1 Pruebas de susceptibilidad.....	41
7.2 Mutaciones Kdr.....	48
7.3 Pruebas bioquímicas.....	55
7.4 RNA-seq.....	58
7.4.1 Genes diferencialmente expresados.....	58
7.4.2 Genes diferencialmente expresados relacionados a la selección con deltametrina.....	58
7.4.3 Función biológica de los genes diferencialmente expresados.....	64
8. DISCUSIÓN.....	66
8.1 Pruebas de susceptibilidad.....	66
8.2 Mutaciones Kdr.....	67
8.3 Pruebas bioquímicas.....	67
8.4 RNA-seq.....	68
8.4.1 Función biológica de los genes diferencialmente expresados.....	68
8.4.2 Genes de digestión.....	68
8.4.3 Genes de función Redox y mitocondrial .....	69
8.4.4 Genes de reproducción.....	69



8.4.5 Genes de función proteosomal.....	70
8.4.6 Genes cuticulares.....	71
8.4.7 Genes de transporte.....	72
8. CONCLUSIONES.....	73
9. BIBLIOGRAFÍA.....	74
10. RESUMEN BIOGRÁFICO	

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1. Modo de acción de algunos insecticidas, según su grupo toxicológico recomendados por la OMS para el control de larvas y mosquitos adultos.....	5
2. Mecanismos que confieren resistencia a importantes clases de insecticidas empleados para el control de mosquitos.....	9
3. Información geográfica de las poblaciones de mosquitos.....	21
4. Líneas de <i>Aedes aegypti</i> y selección con insecticidas para comparar los perfiles de expresión.....	25
5. Concentraciones <i>knockdown</i> (CK <sub>50</sub> y CK <sub>90</sub> a deltametrina y factor de resistencia (FR) para hembras de <i>Ae aegypti</i> en la generación basal y las generaciones de selección.....	42
6. Concentración letal (CL <sub>50</sub> y CL <sub>90</sub> ) a deltametrina y factor de resistencia (FR) para hembras de <i>Ae aegypti</i> en la generación basal y las generaciones de selección (F <sub>S0</sub> - F <sub>S5</sub> ).....	43
7. Heredabilidad ( $h^2$ ) obtenida para los parámetros CL <sub>50</sub> y CK <sub>50</sub> a través de cuatro generaciones de selección con deltametrina.....	46
8. Estimación de la heredabilidad ( $h^2$ ) de la resistencia in <i>Aedes aegypti</i> después de la selección con deltametrina para el parámetro concentración letal cincuenta (CL <sub>50</sub> ).....	46
9. Estimación de la heredabilidad ( $h^2$ ) de la resistencia in <i>Aedes aegypti</i> después de la selección con deltametrina para el parámetro concentracion <i>knockdown</i> cincuenta (CK <sub>50</sub> ).....	47

10. Frecuencias de las mutaciones V410L, V1016I y F1534C en hembras de <i>Aedes aegypti</i> después de la selección con deltametrina.....	50
11. Genotipos y frecuencia de individuos triple homocigoto resistente LL/II/CC a través de generaciones de selección (IC del 95%).....	52
12. Cuantificación de la actividad enzimática en poblaciones de <i>Aedes aegypti</i> en la generación basal y en cada generación de selección con respecto a la cepa de referencia de New Orleans.....	56
13. Genes diferencialmente expresados por población por comparación biológica.....	58
14. Genes diferencialmente expresados compartidos entre las poblaciones FS0 de acuerdo a las comparaciones biológicas FS0 Vs New Orleans (FC >2.0 & adjP<0.05).....	61
15. Genes diferencialmente expresados compartidos entre las poblaciones FS4 de acuerdo a las comparaciones biológicas FS4 Vs FS0 (FC >2.0 & adjP<0.05).....	62

## INDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Ubicación de poblaciones que se han sometido a algún tipo de bioensayo (susceptibilidad y dosis respuesta, para adultos y larvas) para ambas clases de insecticidas organofosforados y piretroides (2006-2015), superpuestas en un mapa de aptitud ambiental para <i>Ae. aegypti</i> y <i>ae. albopictus</i> de Kraemer et al. (2015). Tomado y modificado de Moyes et al. (2017) <a href="https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005625">https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005625</a> .....	8
2. Poblaciones de estudio comprendidas en los estados Veracruz y Yucatán.....	21
3. a) Factor de Resistencia para CL50 y b) CK50 como respuesta a la selección con deltametrina.....	45
4. Frecuencias de triple homocigoto resistente LL410/ II1,016/CC1,534 a través de la selección.....	54

5.	a) genes DE entre las poblaciones FS0 Vs N. Or; b) Genes DE entre las poblaciones FS4 Vs FS0.....	59
6.	Total, de genes encontrados en la generación basal FS0 y en la FS4 agrupados por categorías.....	64
7.	Categorías biológicas de los genes encontrados en los contrastes FS0 Vs NOr y FS4 Vs FS0.....	65

## LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

AchE	Acetilcolinesterasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
Ae	<i>Aedes</i>
C	Centígrados
CCE	Carboxilcolinesterasa
CDC	Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades
CENAPRECE	Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades
CUT	Cutícula
CL <sub>50</sub>	Concentración Letal Cincuenta
DDT	DicloroDifenilTricloroetano
GST	Glutación S Transferasa
H	Hora
iAcheE	Acetilcolinesterasa insensible
IC	Intervalos de Confianza
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
KD <sub>50</sub>	Knock Down Cincuenta
Kg	Kilogramos
MIV	Manejo integrado de vectores

mL	Mililitros
Mg	Microgramos
Min	Minutos
μl	Microlitros
MFO	Oxidasas de función múltiple
Mg	Miligramos
Mm	Milímetro
N	Tamaño de muestra
NaCl	Cloruro de Sodio
NO	New Orleans
nmol	Nanomol
OMS	Organización Mundial de la Salud
OP	Organofosforados
OPS	Organización Panamericana de Salud
P	Probabilidad
p99	Percentil 99
Pb	Pares de bases
PBO	Butóxido de piperonilo
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PTN	Proteínas Totales
RR	Razón de Resistencia
Sem	Semana
SINAVE	

SSA	Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica
T	Secretaría de Salud
UBV	Tiempo
ULV	Ultra Bajo Volumen
Var	Ultra-Low Volume
®	Variación
	Marca registrada

## RESUMEN

La exposición prolongada a insecticidas, presiona y selecciona poblaciones de mosquitos altamente resistentes. En este estudio se determinaron los parámetros de susceptibilidad a deltametrina  $CK_{50}$  y  $CL_{50}$  en seis poblaciones de *Aedes aegypti* a través de cinco generaciones de selección, así mismo, se determinó la heredabilidad de la resistencia a deltametrina ( $h^2$ ) con el conjunto de parámetros obtenidos ( $CK_{50}$  y  $CL_{50}$ ). La frecuencia de las mutaciones kdr V410L, V1016I y F1534C y los niveles de actividad de tres familias de enzimas (esterasas [ $\alpha$  y  $\beta$ ], oxidasas de función mixta y glutatión S-transferasas) relacionadas con la desintoxicación a insecticidas fueron determinados en cada generación. Finalmente comparamos los niveles de expresión de genes que confieren resistencia. Nuestros resultados señalan un incremento en los valores de  $CK_{50}$  y  $CL_{50}$  después de la selección con deltametrina ( $F_{S5}$  vs  $F_{S0}$ ). De acuerdo con los factores de resistencia (FR), obtuvimos incrementos de 1.5 a 5.6 veces para  $CL_{50}$  y 1.3-3.8 veces para  $CK_{50}$ . Los individuos triple homocigoto resistentes (tri-locus, LL / II / CC) estuvieron presentes en la generación parental y aumentaron en frecuencia después de la selección con deltametrina. La frecuencia de L410 aumentó de 1.18 a 2.63, I1016 se entre 1.19 y 2.79 veces, y C1534 se fijó en todas las cepas después de la selección con deltametrina. La actividad enzimática varió significativamente durante las generaciones de selección. Sin embargo,  $\alpha$  y  $\beta$  esterasas permanecieron alteradas en algunas poblaciones y solamente dos mostraron un incremento en los niveles medios de actividad de GST después de la selección con deltametrina. Los genes diferencialmente expresados fueron agrupados en 12 categorías. Los genes de cutícula (CUT) fueron los más sobreexpresados después de la selección con deltametrina. Los elevados parámetros de susceptibilidad y su asociación con altas frecuencias de mutaciones kdr (V410L, V1016I y F1534C), así como, la sobreexpresión de genes de cutícula (CUT) sugieren un papel importante en la resistencia a la deltametrina. Con base a estos resultados, destacamos la necesidad de implementar estrategias que involucren el monitoreo de frecuencias kdr y profundizar en el análisis de la morfología y composición cuticular en *Aedes aegypti* y asociación de estos genes en la resistencia cuticular a piretroides.

## ABSTRACT

Prolonged exposure to insecticides, press and select populations of mosquitoes highly resistant. In this study the parameters of susceptibility to deltamethrin  $KC_{50}$  and  $LC_{50}$  were determined in six natural populations of *Aedes aegypti* through five generations of selection, the set of parameters obtained ( $KC_{50}$  and  $LC_{50}$ ) was subjected to heritability analysis of resistance ( $h^2$ ). Likewise, the frequency of the *kdr* mutations V410L, V1016I, F1534C and the activity levels of three enzyme families (esterases [ $\alpha$  and  $\beta$ ], mixed function oxidases and glutathione S-transferases) related to insecticide detoxification were determined in each generation. Finally, we compare the expression levels of genes that confer resistance. Our results indicate an increase in the values of  $KC_{50}$  and  $LC_{50}$  after selection with deltamethrin ( $F_{S5}$  vs  $F_{S0}$ ). According to the resistance factors (FR), we obtained increments of 1.5 to 5.6 times for  $LC_{50}$  and 1.3-3.8 times for  $KC_{50}$ . Triple homozygous resistant individuals (tri-locus, LL/II / CC) were present in the parental generation and increased in frequency after selection with deltamertin. The frequency of L410 increased from 1.18 to 2.63 for V1016 an increase was observed between 1.19 and 2.79 times, and C1534 was fixed in all strains after deltamethrin selection. Enzymatic activity varied significantly during the generations of selection. However, only  $\alpha$  and  $\beta$  esterases remained altered in some of the populations and only two populations showed an increase in the average levels of GST activity after selection with deltamethrin. Differentially expressed genes were grouped into 12 categories. The cuticle genes (CUT) were the most overexpressed after selection with deltamethrin. The high susceptibility parameters and their association with high frequencies of *kdr* mutations (V410L, V1016I and F1534C), as well as cuticle gene overexpression (CUT) suggest an important role in resistance to deltamethrin. Based on these results, we highlight the need to implement strategies that involve monitoring of *kdr* frequencies and deepen the analysis of the morphology and cuticular composition in *Aedes aegypti* and association of these genes in pyrethroid cuticular resistance.



## 1. INTRODUCCIÓN

El dengue es una importante infección arboviral emergente y reemergente a nivel mundial, con transmisión en más de 128 países de las regiones de Asia, América, África sudoriental, Pacífico occidental y Mediterráneo oriental (Zyoud 2016). La Organización Mundial de la Salud (OMS) calcula entre 50 y 100 millones de infecciones (Wilson y Chen 2015). La fiebre Chikungunya hasta el 2005 fue considerada endémica de algunas partes de África, el sureste de Asia y en el subcontinente indio. El primer caso confirmado en México, corresponde a un caso importado en mayo de 2014, en el estado de Jalisco (Rivera 2014). Los brotes recientes de ZIKV entre 2007-2013, desde la Isla del Pacífico de Yap y la Polinesia Francesa (Hall 2017) y su rápida diseminación en el continente americano en marzo de 2016 han convertido a este virus en un tema de preocupación internacional (Hennessey et al. 2016).

La alta infestación de *Ae. aegypti* y la presencia de *Ae. albopictus* en algunas partes del territorio nacional representan un riesgo en la transmisión de estas enfermedades. Actualmente, no existen vacunas ni tratamientos específicos para ninguna de estas enfermedades y los esfuerzos por desarrollar una vacuna contra el dengue han sido poco exitosas. Por lo que la reducción o eliminación de los criaderos para el control de mosquitos y el control químico con el uso de larvicidas y adulticidas, siguen siendo las principales estrategias para reducir el contacto vector-humano y romper la transmisión de estas enfermedades (WHO 2017).

Los insecticidas juegan un papel importante en los programas de control de *Ae. aegypti* (Flores et al. 2006). Los organofosfatos, organoclorados, carbamatos y piretroides son los más utilizados (WHO 2012; Moyes et al. 2017). Los piretroides son la primera línea de defensa para romper la transmisión de estas enfermedades (Amelia et al. 2018), fueron los primeros autorizados para impregnar materiales para actividades insecticidas de larga duración (WHO 2007) y los más utilizados debido a su baja toxicidad para los mamíferos incluyendo al humano (Ray y Fray 2006) y su alta selectividad en insectos (Wolanskay y Harrill 2008).

En México a mediados de los años 50's el DDT fue ampliamente empleado para el combate de vectores del dengue y la malaria, seguido del malatión empleado como

rociado UBV por casi 20 años, posteriormente la permetrina por más de 10 años y reemplazada por el piretroide fenotrina en el 2011 (SSA 2008). Sin embargo, la exposición prolongada a los mismos, inevitablemente presiona y selecciona a las poblaciones haciéndolas altamente resistentes (Brogdon y McAllister 1998a). Los primeros reportes de resistencia en mosquitos del género *Aedes* fueron en los años 50's en Florida USA (Brown 1958; Liu 2015).

La resistencia es uno de los principales obstáculos para el éxito de los programas de control (Flores et al. 2006; Stevenson et al. 2012; Aponte et al. 2013) y está mediada por dos mecanismos principales: por alteración en el sitio objetivo para el insecticida (alteración de mutaciones de resistencia a la acetilcolinesterasa o de derribo (kdr) en canales de sodio dependientes del voltaje) o actividad metabólica alterada (Brogdon y Mc Allister 1998a; Liu 2015).

La resistencia metabólica está mediada principalmente por glutatión S-transferasas (GST), esterasas y oxidasas de función mixta (MFO) (Hemingway y Ranson 2000). Los GST se han relacionado con la resistencia al DDT y a la resistencia a los organofosfatos y a los carbamatos (Hemingway et al. 2004). Hay al menos 11 mutaciones reportadas en mosquitos en todo el mundo que confieren resistencia, de las cuales V1016I/G (V a I/G) en el dominio II y F1534C (F a C) en el dominio III son las más reportadas en *Aedes aegypti* (Saavedra et al. 2007; Yanola et al. 2011). En México, además de estas mutaciones, también se ha informado de la presencia de I1011M (I a M) y recientemente V410L (V a L) (Saavedra et al. 2018).

El monitoreo de la resistencia y la detección oportuna de genes y proteínas, involucrados en los mecanismos de resistencia, son preponderantes para el desarrollo de herramientas y prácticas que garanticen el uso racional de insecticidas y éxito de los programas de control (Stevenson et al. 2012; Poupardin et al. 2014). Por tal motivo, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la selección con deltametrina y determinar los perfiles de transcripción de genes que codifican para diferentes procesos que pueden contribuir en la tolerancia a insecticidas en *Aedes aegypti* bajo selección artificial con insecticidas en comparación con una cepa susceptible, a lo largo de cinco generaciones de selección.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 *Aedes aegypti* (Linnaenus, 1762)

Es un insecto pequeño de color oscuro, pertenece al orden Diptera, familia Culicidae, subfamilia Culicinae, género *Aedes* y subgénero *Stegomia*; es fácilmente reconocida taxonómicamente por la presencia de dos líneas blancas color plateado en forma de lira en dorso del tórax del adulto y las bandas blancas que posee en los segmentos tarsales, por el cual también se le conoce como mosquito tigre (Pratt y Moore 1993).

Es una especie holometábola, en su ciclo de vida pasa por dos fases bien diferenciadas: la fase acuática, en el cual transcurren las etapas de huevo, larva y pupa, y la fase aérea a la cual corresponde el adulto; es una especie semi-domestica, sus hábitats larvales son casi exclusivamente recipientes artificiales en los alrededores de las viviendas (Pratt y Moore 1993). Es originaria de la región etíope, se cree fue traída al nuevo mundo tan pronto como iniciaron los viajes de exploración y conquista, posee una distribución cosmotropical, en general dentro de las latitudes 35° N y 35° S que corresponden a la isoterma de verano de 10° C, aunque su distribución puede sobrepasar estos límites en ciertas épocas del año (Gómez-Dantes e Ibáñez-Bernal 1994).

### 2.2 Importancia como vector

*Aedes aegypti* por sus hábitos hematofágicos es capaz de ingerir, incubar y transmitir diferentes patógenos capaces de producir enfermedades tales como, fiebre amarilla, dengue, chikungunya y Zika (Philip y Rozenboom 1973; Kandel et al. 2019). En México tenemos presentes al menos tres de estas enfermedades, dengue, chikungunya y Zika de las cuales se ha considerado vector principal (Van Bortel et al. 2014; García-Luna et al. 2018).

Estudios sobre costo-efectividad de las estrategias de lucha contra el dengue, señalan una carga económica de 2.1 billones de dólares anuales para la región de las américas (Shepard et al. 2011) y una carga de 590 millones de dólares en el sureste de Asia (Jensenius et al. 2013), cabe señalar que dichas estimaciones no contemplan los

costos de control contra el vector (Stahl et al. 2013) y que los costos están directamente asociados a la incidencia de las enfermedades (Marcos-Marcos et al. 2018).

### 2.3 Control

La iniciativa lanzada por la OMS en 2012 para la prevención y el control del dengue 2012-2020 promueve la acción coordinada multisectorial, con un enfoque integrado de control (MIV) el cual involucra la acción combinada de: manejo ambiental, control químico y control biológico, con el objetivo de mejorar la eficacia, costo eficacia, solidez ecológica y sostenibilidad de las intervenciones del control de vectores de enfermedades (WHO 2012). Sin embargo, el reconocimiento de la gravedad, magnitud y futuras implicaciones, requiere un fuerte compromiso no solo localmente sino a nivel global, se requiere más inversión, soporte e implementación de los resultados obtenidos en materia de investigación (Guzman y Harris 2015). De acuerdo a estudios recientes el MIV en efecto, tiene un impacto en la reducción de sitios de cría y por ende mejora los índices entomológicos (Marcos-Marcos et al. 2018).

La OMS por su parte, por medio de la “WHO Pesticide Evaluation Scheme” “WHOPES”, creada en 1960, también regula, coordina y promueve la evaluación de plaguicidas empleados en salud pública, con el objetivo de facilitar la búsqueda de plaguicidas alternativos y métodos de aplicación que sean seguros y rentables, así como el desarrollo y promoción de políticas, estrategias y directrices para la aplicación selectiva y juiciosa de plaguicidas previniendo la resistencia; asiste y supervisa la aplicación de los mismos en los estados miembros (WHO 2012).

Los insecticidas orgánico-sintéticos han jugado un papel muy importante para el control del vector del dengue (Abbas et al. 2014). Las principales clases de insecticidas empleados para el control de vectores a nivel mundial son los Organoclorados, Piretroides, organofosforados, carbamatos y neonicotinoides (WHO 2018), aunque comienzan a utilizarse en gran escala los insecticidas microbianos como *Bacillus thuringiensis israelensis*, así como los reguladores del crecimiento diflubenzuron, metopreno, novaluron y piriproxifen (Becker et al. 2010).

Los grupos toxicológicos antes mencionados para el control de mosquitos poseen sitios de acción específicos en el sistema nervioso sobre los cuales actúan convirtiéndolos en “agentes de acción rápida” (Tabla 1).

**Tabla 1. Modo de acción de algunos insecticidas, según su grupo toxicológico recomendados por la OMS para el control de larvas y mosquitos adultos.**

Estado	Grupo toxicológico	Insecticida	Modo de acción	Sitio de acción (sitio blanco)
<b>Adulto</b>	Organofosforados	Fenitrothion, malation Pirimifos-metil	Contacto y aerotransporte	Acetilcolinesterasa
	Carbamatos	Bendiocarb Propoxur	Contacto y aerotransporte	Acetilcolinesterasa
	Piretroides	$\alpha$ -cipermetrina, bifentina, ciflutrina, <b>deltametrina</b> , etofenprox, $\lambda$ -cialotrina	Contacto	Canal de sodio
	Organoclorado	DDT	Contacto	Canal de sodio
	Neonicotinoide	Clotianidina	Contacto	Receptor de la acetilcolina nicotínico
<b>Larva</b>	Organofosforado	Fentión, clorpirifos, pirimifos-metil, temefos	-	Acetilcolinesterasa
	Benzoilureas	Diflubenzuron, novaluron	-	Biosíntesis de la quitina
	Análogos de la HJ	Piripróxifen	-	Imitador de la hormona juvenil
	Microbiales	<i>Bacillus thuringiensis</i>	-	Disruptor de la membrana del intestino medio
	Espinosinas	Spinosad	-	Activador del receptor de la acetilcolina nicotínico

[http://www.who.int/whopes/Insecticidas\\_IRS\\_Malaria\\_25\\_Oct\\_2013.pdf](http://www.who.int/whopes/Insecticidas_IRS_Malaria_25_Oct_2013.pdf)

[http://www.who.int/whopes/Mosquito\\_Larvicides\\_25\\_Oct\\_2013.pdf](http://www.who.int/whopes/Mosquito_Larvicides_25_Oct_2013.pdf)

En el contexto nacional, como propuesta de modificación de la Norma Oficial Mexicana para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vectores NOM-032-SSA2-2010, a partir del 2011 se promueve el manejo integrado de vectores. Por conducto del CENAPRECE, se establece que el insecticida no debe exhibir resistencia manifiesta en la población de insectos objeto del control en laboratorio y campo de acuerdo al “Manual para la Vigilancia, Diagnóstico, Prevención y Control de Dengue”, por lo tanto, los insecticidas empleados deberán ser de probada eficacia para el objetivo de salud pública que se persigue, es decir, mortalidad >98% en bioensayos estándar de la especie examinada.

Los productos insecticidas deben reunir ciertos requisitos para lo cual el CENAPRECE cuenta con una lista de productos recomendados para el combate de insectos vectores: ([https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/463525/Lista\\_de\\_Insecticidas\\_recomendados\\_por\\_CENAPRECE\\_2019.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/463525/Lista_de_Insecticidas_recomendados_por_CENAPRECE_2019.pdf)).

### **2.3.1 Insecticidas piretroides**

Los insecticidas piretroides sintéticos fueron desarrollados en Rothamsted Research entre los años 60's y 70's, las primeras investigaciones fueron hechas por Michael Elliott en 1948 y estaban dirigidas a entender la estructura molecular y la actividad biológica de las piretrinas naturales. Los piretroides sintéticos son más fotoestables y significativamente más efectivos contra una amplia variedad de insectos en comparación con las piretrinas naturales. Actúan a nivel de la membrana celular del sistema nervioso de los insectos, prolongando la apertura de los canales de sodio, paralizando al insecto y matándolo (Elliott 1976; Davies et al. 2007).

En 1962 se desarrolla la resmetrina “primera generación de piretroides sintéticos” y en 1972 se desarrolla la permetrina, un piretroide mucho más estable y menos persistente en el ambiente a diferencia del DDT. Más tarde en 1976 de manera independiente Sumitomo desarrolla el fenvalerato, esto capto la atención de Elliott, y no más tarde desarrollo la cipermetrina y la deltametrina en colaboración con Yamamoto. En 1980 la OMS recomienda el uso de piretroides permetrina y deltametrina para ITN's y a la fecha son los únicos autorizados para impregnar estas redes debido a su baja toxicidad en mamíferos incluyendo al hombre (BBSRC, 2014).

De acuerdo a sus diferencias estructurales y sus síntomas de toxicidad en roedores, los piretroides han sido divididos en dos grupos. Piretroides tipo I (aletrina y permetrina) carecen de un grupo estructural en la posición  $\alpha$ -ciano y provocan un síndrome de intoxicación que incluyen temblor general, hiperactividad y contracciones convulsivas. Distintivamente los piretroides tipo II (deltametrina y cipermetrina) poseen el grupo  $\alpha$ -ciano, estos inducen a una despolarización y subsecuentemente una parálisis (Soderlund, 2012).

La aplicación de piretroides en México para el control de vectores data desde 1999, tras eliminar el uso regular del DDT para el control de vectores y marca su inicio

con la introducción de la permetrina para rociado espacial UBV, al mismo tiempo, se autoriza el uso de deltametrina para rociado residual intradomiciliar. En 2011 se suspende el uso de permetrina, sin embargo, la deltametrina continua su uso como adulticida, para 2012 se suman otros piretroides a la lista, y en 2016 se autoriza su uso para aplicación en ULV.

### **2.3.2 Deltametrina**

La deltametrina se desarrolló en el año de 1976, es un piretroide tipo II de amplio espectro. Este piretroide ha sido más vendido a nivel mundial y el más usado por el sector agrícola por ser ingrediente activo de muchos productos para aplicaciones en una amplia gama de cultivos, así como en exteriores e interiores contra plagas como lepidópteros, hemípteros, áfidos, coleópteros y dípteros, actúa por contacto y por envenenamiento estomacal (BBSRC, 2014; Prusty et al. 2015).

## **2.4 Resistencia a insecticidas**

El DDT fue el primer químico empleado para el control de *Ae. aegypti* en las campañas de erradicación durante la década de los 60's, sin embargo, el desarrollo de resistencia al mismo, fue un factor clave que contribuyo a la reemergencia del vector en varios países que habían sido declarado libres de *Ae. aegypti* (Bisset 2002, Becker et al. 2010).

La resistencia como lo define la OMS (1957) “es la capacidad heredada de una cepa de un organismo para tolerar dosis de un toxico que normalmente mataría a la mayoría de los individuos en una población normal de una misma especie” o bien es el cambio heredable en la sensibilidad de una población a un insecticida, que se refleja en el campo de fallo repetido de ese producto para alcanzar el nivel previsto de control cuando se utiliza de acuerdo con las recomendaciones de la etiqueta para las especies plaga, y donde los problemas de almacenamiento del producto, aplicación y las condiciones climáticas o ambientales habituales pueden eliminarse (Mc Caffery y Nauen 2006).

La resistencia a piretroides no se desarrolla por un solo mecanismo, la presión de selección puede producir cambios en la expresión de genes que modulan enzimas de

desintoxicación, provocando resistencia cruzada a otros grupos toxicológicos. Varios estudios han reportado resistencia cruzada al DDT y piretroides (Lumjuan et al. 2011) y resistencia cruzada a otros insecticidas como organofosforados y carbamatos, la resistencia múltiple también ha sido documentada en algunos países de América Latina.

Los registros de resistencia más actuales son para insecticidas piretroides y organofosforados, dichos registros se distribuyen geográficamente en las Américas y Asia principalmente (Figura 1) (Moyes et al. 2017).

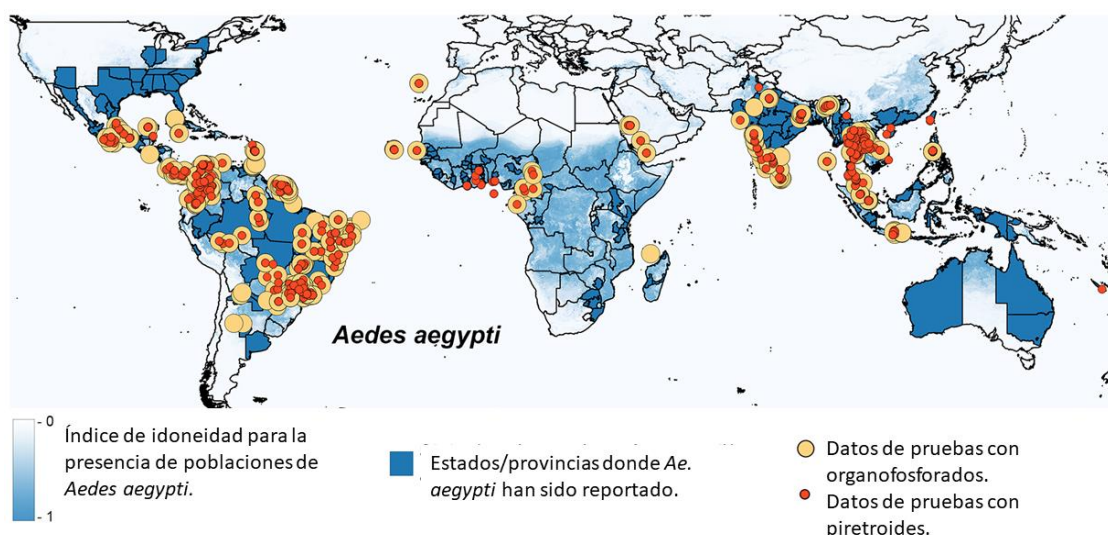


Figura 1. Ubicación de poblaciones que se han sometido a algún tipo de bioensayo (susceptibilidad y dosis respuesta, para adultos y larvas) para ambas clases de insecticidas organofosforados y piretroides (2006-2015), superpuestas en un mapa de aptitud ambiental para *Ae. aegypti* y *ae. albopictus* de Kraemer et al. (2015). Tomado y modificado de Moyes et al. (2017). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005625>

### 2.4.1 Mecanismos de resistencia

La resistencia puede deberse a viarios mecanismos, dentro de los más reportados se incluyen, insensibilidad en el sitio de destino por la presencia de mutaciones tipo *kdr* y la actividad enzimática incrementada involucrada en la desintoxicación de insecticidas (Brogdon y McAllister 1998a, Nauen 2007, Saavedra et al. 2008, Liu 2015) (Cuadro 2).

La penetración reducida también ha sido reportada y es causada por la modificación en la cutícula del insecto, sin embargo, aún es poco estudiada y entendida y su importancia en mosquitos *Aedes* aún no ha sido confirmada (Moyes et al. 2017).



**Tabla 2. Mecanismos que confieren resistencia a importantes clases de insecticidas empleados para el control de mosquitos.**

Grupo toxicológico	Insecticida	Sitio de acción	Mecanismos de resistencia				
			Metabólico			Sitio de destino	
			CCE	OFM	GST	Kdr	AchE
Piretroides	Piretroide tipo I	Canal de sodio	•	•	•	•	
	Piretroide tipo II	Canal de sodio	•	•		•	
Organoclorados	DDT	Canal de sodio		•	•	•	
Organofosforados	Organofosforados	Acetilcolinesterasa					•
Carbamatos	Carbamatos	Acetilcolinesterasa					•
Neonicotinoide	Clotianidina	Receptor de la acetilcolina nicotínico		•			
Benzoilureas	Novaluron	Biosíntesis de la quitina	Ninguno reportado				
Análogo de la HJ	Piriproxifen	Imitadores de la hormona juvenil	Ninguno reportado				
Espinosinas	Spinosad	Receptor de acetilcolina nicotínico	Reportado en <i>Ae. albopictus</i> , pero sin mecanismo asociado (Khan et al., 2011).				
Microbial	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Disruptor microbiano de la membrana del intestino medio del insecto	Reportado en <i>Culex</i> pero no descrito (Wirth, 1998)				

CCE= Carboxicolinesterasa; OFM= Oxidasas de función múltiple; GST= Glutathion-S-transferasas

#### 2.4.2 Resistencia por insensibilidad en el sitio de destino

La insensibilidad en el sitio de destino se debe a un cambio estructural o mutación (mutación puntual) de genes que codifican proteínas diana que interactúan con el insecticida. Tres mecanismos de insensibilidad en el sitio de destino han sido descritos: 1) kdr por sus siglas en inglés del “*knockdown* resistance” es una mutación en el canal del sodio dependiente de voltaje, 2) acetil colinesterasa modificada MACE por sus siglas en inglés “*modified acetylcholinesterase*” y 3) rdl resistencia al dieldrin “*resistance to dieldrin*” es una mutación en los canales del cloro de los receptores GABA (Nauen 2007, Liu 2015).

Este mecanismo por insensibilidad en el sitio de destino puede conferir resistencia cruzada a uno o más tipos de insecticidas, por ejemplo, las mutaciones en el canal del sodio dependientes de voltaje pueden generar resistencia cruzada entre el DDT

y piretroides, y las mutaciones AChE entre organofosforados y carbamatos (Casida et al. 1998).

*Resistencia kdr.* Las mutaciones tipo “*kdr*” que confieren resistencia a piretroides y al DDT se encuentran en el segmento seis de los dominios I (IS6), II (IIS6) y dominio III (IIIS6) en las proteínas de los canales de sodio dependientes de voltaje (Martínez et al. 1998, kawada et al. 2009; Haddi et al. 2017), la clonación del dominio II del canal de sodio en *Musca domestica*, ha demostrado estar relacionado con la resistencia *kdr* y *super-kdr* (Martínez et al. 1997).

Existen al menos 11 mutaciones reportadas en mosquitos a nivel mundial, de los cuales V1,016 (V a I/G) en el dominio II y F1534 (F a C) en el dominio III son las más reportadas en *Aedes aegypti* (Saavedra et al. 2007, Yanola et al. 2011).

La mutación C1534F ha sido ampliamente reportada coexistiendo con la V1016I en poblaciones de *Ae. aegypti* en América Latina (Yanola et al. 2010, 2011; Álvarez et al. 2015; Vera-Maloof et al. 2015; Maestre-Serrano et al. 2019) incluyendo México.

Estudios previos sobre poblaciones de *Aedes aegypti* en los estados de, Yucatán, Quintana Roo, Chiapas, Guerrero, Veracruz, Nuevo León y Tamaulipas, comprendidas en el país, señalan la presencia y frecuencia de estas mutaciones. La mutación V1016I la más reportada, seguida de la C1534F, otras mutaciones como la I1011M (I a M) también han sido reportadas (Saavedra-Rodríguez et al. 2007; Ponce et al. 2009; Rajatileka et al. 2011; Aponte et al. 2013; Saavedra et al. 2015) y V410L (V a L) en el dominio I el reporte más reciente (Saavedra et al. 2018).

El uso de piretroides, particularmente permetrina por más de 10 años en México (1999-2011), ha sido vinculado con la presión de selección de las poblaciones de *Ae. aegypti* y a las altas frecuencias de estas mutaciones (Siller et al. 2011; Aponte et al. 2013).

#### **2.4.3 Resistencia Metabólica**

La resistencia metabólica por actividad enzimática elevada esta conferida a la sobreexpresión/amplificación de tres grandes familias de genes como: 1) esterasas, 2) monooxigenasas dependientes de citocromo P-450 y 3) Glutathion S-transferasas (Nauen 2007; Liu 2015).

La presencia de agroquímicos empleados en el sector agrícola, así como, contaminantes urbanos e industriales y xenobióticos naturales de plantas o agentes microbiales en criaderos de mosquitos, son factores ambientales que pueden ejercer un impacto en la respuesta de los mosquitos a los insecticidas piretroides, por incremento en la actividad enzimática ejercida por la exposición a estos agentes (Nkya et al. 2013).

Un estudio reciente, Lampman et al. (2014) evaluó el papel de las CYPs en la tolerancia de infusiones de plantas combinadas con el inhibidor de CYPs butóxido de piperonilo (PBO) en *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* mediante ensayos de toxicidad aguda, los resultados revelan que la presencia del inhibidor enzimático tiene un efecto en la mortalidad aguda para ambas especies, estos hallazgos sugieren que algunos componentes de la hojarasca en los hábitats larvarios pueden imponer costos de energía crípticos en la desintoxicación. Boyer et al. (2006) en un estudio previo evaluó la tolerancia de larvas en tres diferentes compuestos tóxicos, sus resultados muestran una fuerte correlación con enzimas inducidas o preexistentes en las poblaciones de estudio, estos datos señalan que la elevada actividad enzimática de CYPs, esterasas y glutatión s-transferasas incrementan la tolerancia de las larvas de *Ae. aegypti* a los xenobióticos expuestos.

*Esterasas.* Estas enzimas poseen una variedad de funciones, como degradación, metabolismo y desintoxicación (Vogt et al. 1985; Taylor y Radic, 1994), están involucradas con la resistencia a organofosforados y carbamatos (Hemingway et al. 2004).

Actúan por hidrólisis y secuestro de enlaces éster, también abarca la hidrólisis de un amplio rango de sustratos carboxil, tio, fosfo y otros ésteres. Se encuentran a su vez dentro de un conjunto de reacciones hidrolasa, incluyendo glicolasas, proteasas y amidasas (Webb 1992). En relación a la clase de inhibidor pueden clasificarse en cuatro clases: 1) acetilesterasas, generalmente prefieren sustratos con grupos ácido acetil y aromáticos de alcohol, 2) arilesterasas, solo son inhibidas por reactivos sulfidral y generalmente prefieren sustratos con grupo aromático de alcohol, 3) carboxilesterasa, que son inhibidas por organofosforados, prefieren ésteres alifáticos han identificado en varias especies de insectos incluyendo mosquitos (Strode et al. 2008; Yu et al. 2009). 4) colinesterasas, generalmente inhibidas por organofosforados y sulfato eserina, prefieren

sustratos con restos de alcohol cargadas como ésteres de colina sobre otros ésteres aromáticos o alifáticos.

Una clasificación adicional se ha aplicado ampliamente para las carboxilesterasas, especialmente en *Drosophila* y mosquitos, de acuerdo con su hidrólisis preferencial de los sustratos isoméricos artificiales, acetato de  $\alpha$  y  $\beta$ -naftil (Hemingway y Karunaratne, 1998; Oakeshott et al. 2010).

*Acetilcolinesterasas.* Estas enzimas (AChE) actúan en la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina después de haberse unido a la sinapsis colinérgica (Oakeshott et al., 2010), empleando dicha hidrólisis para reiniciar la sinapsis. La actividad elevada de estas enzimas, confieren resistencia a organofosforados y carbamatos (Hemingway y Georghiou, 1983).

*Citocromo P-450.* Es una importante familia de enzimas hidrofóbicas, involucradas en el metabolismo oxidativo de numerosos compuestos endógenos y exógenos, pueden conferir resistencia principalmente a piretroides y carbamatos y en menor medida a organoclorados y organofosforados (Coleman y Hemingway 2007). Metabolizan insecticidas a través de hidroxilaciones N-alquil, hidroxilaciones alifáticas y epoxidaciones, hidroxilaciones aromáticas, oxidación éster, oxidación de nitrógeno y tio-éter (Wilkinson, 1976).

En animales y plantas son conocidas por llevar a cabo diferentes reacciones enzimáticas esenciales en procesos como síntesis de hormonas y desintoxicación a algunos compuestos ambientales (Chung et al. 2009). Se encuentran en prácticamente todos los tejidos de insectos, cumplen muchas tareas importantes, como la síntesis y degradación de ecdisteroides y hormonas juveniles, en el metabolismo de sustancias químicas extrañas de origen natural o sintético, incluyendo la resistencia a insecticidas o toxinas de plantas. Se han descrito aproximadamente 100 genes de CYPs y cada uno codifica para una enzima diferente (Scott et al. 2001; Feyereisen et al. 2005).

Esta superfamilia de enzimas, se encuentra dividida en cuatro familias de CYP para insectos que son CYP6, 9, 12 y 18 adicionando una, CYP4, que comparte secuencias con otros organismos. Sin embargo, CYP6 es exclusiva de insectos y es la más estudiada (Andersen et al. 1994).

*Glutation S-transferasas.* Estas enzimas generalmente actúan en la desintoxicación de compuestos endógenos y xenobióticos directamente o por catálisis de metabolismo secundario de compuestos de oxidación por CYPs, en la dehidroclorinación del DDT y pueden jugar un rol en la resistencia a piretroides por secuestro de la molécula protegiendo al individuo de la toxicidad (Yang et al. 2001). Pero en general se les ha implicado en la resistencia a la mayoría de los insecticidas de las cuatro clases de insecticidas empleados en general en salud pública. Existen dos clases de estas enzimas en relación a su localización en la célula: microsomales y citosólicas, por sus propiedades cinéticas poseen una pobre clasificación, sin embargo, pueden ser clasificadas con relación a su origen filogenético, propiedades inmunológicas, estructura terciaria y su capacidad de formar heterodímeros en seis clases: delta, épsilon, omega, sigma, teta y zeta, (Hemingway et al. 2004; Enyati et al. 2005). De la clasificación antes mencionada, Delta y Épsilon son específicas de insectos (Ranson et al. 2002; Ding et al. 2003) son las GSTs mayormente implicadas en el metabolismo de insecticidas principalmente DDT (Ranson et al. 1997) y piretroides (Vontas et al. 2001; Riveron, 2014).

*Estudios actividad enzimática en México.* Estudios de resistencia a insecticidas en México han revelado la relación específica de esterasas con el metabolismo de xenobióticos en varios insectos, incluyendo *Ae. aegypti*. Por ejemplo, en un estudio realizado en la península de Baja California, reporta elevados niveles de alfa  $\alpha$ -esterasas asociadas a la presión de selección con permetrina (Flores et al. 2005), las  $\beta$ -esterasas y GST-transferasas también fueron altas en las poblaciones de estudio; niveles elevados de las mismas también se han reportado en poblaciones de Guerrero (Aponte et al. 2013) y Quintana Roo, así como, las oxidasas de función múltiple (OFM) las cuales han sido vinculadas con la resistencia a organofosforados, carbamatos y algunos piretroides, estas enzimas también han sido reportadas en poblaciones de *Ae. aegypti* en Sonora vinculada a la resistencia al piretroide permetrina (Flores et al. 2006, 2009; Saavedra et al. 2007). Altos niveles de  $\alpha$  y  $\beta$ -esterasas también han sido reportados en poblaciones de *Ae. aegypti* del estado de Veracruz, confiriendo moderada resistencias al organofosforado clorpirifos (López et al. 2014). Elevados niveles de iAChE fueron encontrados en

poblaciones de *Ae. aegypti* en Coahuila, relacionadas con la resistencia a organofosforados y carbamatos (Flores et al. 2009).

#### **2.4.3.1 Genes de desintoxicación**

La resistencia a insecticidas en mosquitos es conferida a múltiples genes, vía interacción de genes reguladores y genes de resistencia, e involucra tres grandes familias: Citocromo P450s (P450s o CYPs), son críticas para la desintoxicación y/o activación de compuestos xenobióticos y endógenos, las carboxil-esterasas (CCEs), y glutatión S-transferasas (GSTs) las cuales son proteínas diméricas solubles, involucradas en el metabolismo, desintoxicación y excreción de un gran número de compuestos endógenos y exógenos (Hemingway et al. 2004; Liu 2015).

La expresión de genes tales como CYPs, GSTs y CCEs en menor frecuencia también ha sido documentada en vectores de la malaria, implicados en la resistencia principalmente a piretroides y DDT (Vontas et al. 2005, 2007).

Se han encontrado más de 160 genes citocromo P450 (CYPs) en el genoma de *Ae. aegypti* con al menos cinco subfamilias, estos genes han sido vinculados con la resistencia a piretroides en general, sin embargo, también han sido vinculados a la resistencia a carbamatos y organoclorados, la sobreexpresión de estos genes se reflejan en la adaptación o resistencia a varios insecticidas, más de 40 carboxil-colinesterasas (CCEs) vinculados con la resistencia a organofosforados y varios de la familia de Glutathion-S-transferasas (GSTs) vinculados con la resistencia al DDT y organofosforados (Strode et al. 2008).

Los genes de carboxil-colinesteras, han sido implicados en la resistencia a temefós en *Ae. aegypti* (Poupardin et al. 2014). En México Saavedra et al. (2014), en un estudio de selección con temefós sobre poblaciones de *Ae. aegypti* señaló la sobreexpresión de genes CCEs y señala que estos aumentan a través de las generaciones con la selección, sin embargo, no solo las esterasas se regularon de manera consistente, este mismo patrón se observó en genes CYPs y en otros genes implicados en la reducción u oxidación de los xenobióticos. Bioensayos empleando inhibidores de GSTs, CCEs y CYP, señalan que las CCEs y CYPs como principales mecanismos metabólicos que confieren resistencia al temefós en esas poblaciones, y estos genes se seleccionan

independientemente de la presión con permetrina realizada en un estudio previo (Saavedra et al. 2012).

En un estudio con *Drosophila melanogaster* se caracterizaron los patrones de expresión de 68 genes, la mayoría se expresaron en intestino medio, túbulos de Malpighi y cuerpo graso, sugiriendo roles potenciales en el proceso de desintoxicación y protección contra compuestos exógenos (Chung et al. 2009), otro estudio previo con *Anopheles gambiae* muestra la riqueza de estos CYPs en la región anterior de intestino medio, también vinculados a los mecanismos de desintoxicación (Oviedo et al. 2008).

La familia de genes CYPs está representada por al menos cinco subfamilias en el genoma de *Ae. aegypti*, siendo la subfamilia CYP9 la más abundante, algunos como: CYP9J24, CYP9J26 y CYP9J28, también han sido vinculados con la resistencia a piretroides como la permetrina y la deltametrina (Strode et al. 2008, 2012; Stevenson et al. 2012), particularmente el gen CYPJ32 está fuertemente asociado con la resistencia a deltametrina en México (Strode et al. 2008), Saavedra et al. (2015), reporte recientemente el flujo de estos genes en poblaciones de Yucatán. La subfamilia CYP6 también ha sido vinculada con el metabolismo de xenobióticos, particularmente el gen CYP6AL1 se le ha involucrado con la muda, metamorfosis y/o el metabolismo hormonal (Poupardin et al. 2010).

Otros trabajos han demostrado que la interacción entre la frecuencia de mutaciones puntuales tipo *kdr* con la sobreexpresión de genes P450s pueden conferir altos niveles de resistencia a piretroides en *Ae. aegypti* (Marcombe et al. 2009). En México también existe evidencia de la expresión de genes de desintoxicación directamente relacionados con la frecuencia de mutaciones tipo *kdr* en poblaciones de *Ae. aegypti* (Saavedra-Rodríguez et al. 2013).

Las GSTs han sido vinculadas principalmente con la resistencia al DDT/permetrina, Lumjuan et al. (2011) en un estudio realizado en *Ae. aegypti*, silenciando GSTe7 y GSTe2 con RNA de interferencia encontró un incremento en la susceptibilidad al piretroide deltametrina, sugiriendo que dichas enzimas podrían estar involucrados en la resistencia a piretroides. La sobreexpresión de genes aldehído deshidrogenasa también han sido documentadas ALDH9948 y ALDH14080 en el metabolismo de piretroides (Lumjuan et al. 2014).

#### **2.4.5 Otros genes de resistencia**

Como se describe en apartados anteriores, la resistencia a insecticidas puede deberse a una amplia variedad de cambios en el genoma, tales como, cambios en la transcripción y amplificación de genes, así como, mutaciones puntuales en las regiones de codificación, que se traducen en un aumento de las tasas de desintoxicación insecticida o reducción de la sensibilidad de sitio de destino.

David et al. (2010) ha identificado un gran número de grupos de secuencias que no se encuentran dentro de los genes predichos en el genoma de *Ae. aegypti* que posiblemente indican nuevas uniones de corte y empalme alternativo y unidades transcripcionales, los cuales pueden ser cambios ocasionados por la exposición a contaminantes y xenobióticos. En un estudio más reciente (David et al. 2014), señala que la secuenciación de mRNA a través de varias generaciones de *Ae. aegypti* sometidas a presión con insecticidas, puede demostrar cambios en la calidad y cantidad de transcryptomas asociados con la resistencia a insecticidas en mosquitos. Estos cambios sugieren alteraciones de genes que codifican para otros procesos de metabolismo, desintoxicación y excreción (Hemingway et al. 2004; Liu 2015), replicación, transcripción, transporte, estructurales y de función sináptica (Campbell et al. 2019) respiración celular, actividad endopeptidasa, actividad extracelular y metabolismo de quitina (David et al. 2010; Mackenzie-Impoivil et al. 2018).

#### **2.4.6 Resistencia cuticular**

El exoesqueleto o cutícula de los insectos comprende una procutícula interna formada por capas de endocutícula y exocutícula, una epicutícula externa y la envoltura superficial. La procutícula consiste en una variedad de proteínas y quitina, un polímero de la N-acetilglucosamina derivada de la glucosa. La quitina es un compuesto importante en el exoesqueleto de insectos.

La cutícula es una estructura importante que protege al mosquito y otros insectos de condiciones ambientales adversas u otros microorganismos.

La fisiología y la bioquímica de la formación de cutículas de insectos se han estudiado durante muchos años y nuestra comprensión de la formación y endurecimiento



de la cutícula ha aumentado considerablemente (Liao et al. 2018). Por lo tanto, la identificación de proteínas cuticulares y la determinación de su perfil transcripcional son pasos importantes para obtener una mejor comprensión de la formación y endurecimiento de la cutícula, pero aún queda por establecer exactamente cómo se integran las proteínas cuticulares individuales y la quitina para formar estructuras de cutícula altamente protectoras (Liao et al. 2018).

La fisiología y biosíntesis de las proteínas cuticulares son importantes en la determinación de la resistencia a insecticidas y metales pesados (Klowden, 2013).

Alteraciones en la cutícula también pueden contribuir en la tolerancia a piretroides (Nkya et al, 2013). Estudios de microscopía electrónica han asociado el grosor de la cutícula con la tolerancia a permetrina en *Anopheles funestus* Giles vector de la malaria, el grosor de la cutícula fue significativamente mayor en los ejemplares con el fenotipo resistente, respecto a los ejemplares susceptibles (Wood et al. 2010).

Balabanidou et al. 2019, en un estudio del grosor de la cutícula de las patas en *An. gambiae* demostraron que los mosquitos resistentes remodelan en gran medida las cutículas de sus patas a través de un depósito mejorado de proteínas cuticulares y quitina, lo que corrobora un fenotipo engrosador de las patas. Además, demostraron que los mosquitos hembra resistentes sellan las cutículas de sus patas con cantidades relativamente más altas y diferentes de hidrocarburos cuticulares, en comparación con los susceptibles. Las alteraciones estructurales y funcionales en las patas de mosquito hembra *Anopheles* están asociadas con una absorción reducida de insecticidas, lo que contribuye sustancialmente al fenotipo de resistencia.

### 3. JUSTIFICACIÓN

Los programas de control de vectores de enfermedades demandan el uso de insecticidas como un componente clave. Desafortunadamente el uso prolongado de estos, favorece el desarrollo de resistencia.

En Latinoamérica, incluyendo a México, se han reportado diferentes mecanismos de resistencia en poblaciones de *Ae. aegypti*, como, alteraciones en el sitio de blanco de acción de los insecticidas piretroides, mutaciones kdr principalmente. Así como, la actividad enzimática elevada y la selección de alelos que confieren actividad potenciada de enzimas, sin embargo, dichos mecanismos, siguen siendo poco estudiados y poco comprendidos. El monitoreo de la susceptibilidad en poblaciones de *Ae. aegypti*, el análisis de la expresión e interacción múltiple de genes, asociada al análisis de frecuencias alélicas y el análisis transcripcional de los mismos, así como su caracterización, son preponderantes no solo para el entendimiento del amplio complejo de mecanismos involucrados en la resistencia en poblaciones de *Ae. aegypti*, sino que también pueden ser la base para el diseño de insecticidas alternativos y herramientas o prácticas seguras y rentables, que aumenten el impacto en las intervenciones de prevención de enfermedades arbovirales transmitidas por *Aedes aegypti* en México, con un enfoque de manejo integrado, que contemple la aplicación selectiva y juiciosa de insecticidas.

Como se ha expuesto, la resistencia al DDT y a los piretroides está muy extendida en gran parte del territorio nacional, en este sentido este proyecto aportara evidencia científica acerca de cómo la exposición prolongada a insecticidas a través de varias generaciones, puede resultar en diferentes mecanismos de resistencia regulando expresión de genes involucrados en diferentes procesos capaces de incrementar la tolerancia a los insecticidas en las poblaciones de *Aede agypti*, la expresión de dichos genes a su vez podrían estar involucradas en la resistencia cruzada a otros grupos toxicológicos, así mismo, podrían estar fuertemente asociados al aumento en la frecuencia de las mutaciones asociadas a la resistencia a piretroides en poblaciones de *Aedes aegypti* del sureste de México, a lo largo de cinco generaciones seleccionadas.

## **4. HIPÓTESIS**

La presión de selección ejercida por los insecticidas, es un factor determinante en la selección, inducción y expresión de mecanismos que confieren resistencia a la deltametrina en poblaciones de *Aedes aegypti*.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Origen de las poblaciones bajo estudio

Las larvas y huevos de *Aedes aegypti* fueron recolectados durante 2014 en seis localidades: Mérida, Progreso, Hunucmá y Hochtún en el estado de Yucatán; y Agua Dulce y José Cardel, en el estado de Veracruz.

El estado de Veracruz se extiende del noreste al sureste de México sobre la costa del golfo de México, colinda con siete estados, al norte con Tamaulipas y el Golfo de México, al este con el golfo de México, Tabasco y Chiapas, al sur con Chiapas y Oaxaca y al Oeste con Hidalgo, Puebla y san Luis Potosí. Tiene una extensión territorial de 71, 820 km<sup>2</sup> con una población total de 7, 110, 214 habitantes, presenta al menos cinco tipos de clima, siendo el clima semicálido húmedo el más frecuente y comprende el 54. 1% de su territorio con lluvias todo el año, con un rango de temperatura entre 16-26 °C y un rango de precipitación de 1, 100-1, 600 mm (INEGI, 2012a).

El estado de Yucatán se ubica al norte de la península de Yucatán, colinda al norte con el golfo de México, al oeste y suroeste con el estado de Campeche y al este y sureste con Quintana Roo. Tiene una extensión territorial de 39, 524 km<sup>2</sup> y cuenta con una población total de 1, 955, 577 habitantes, presenta un clima cálido subhúmedo con lluvias en verano y comprende el 84.5% de su territorio; con una temperatura media anual de 26.1°C y una precipitación media anual de 1,011.9 mm (Figura 1) (INEGI, 2012b).

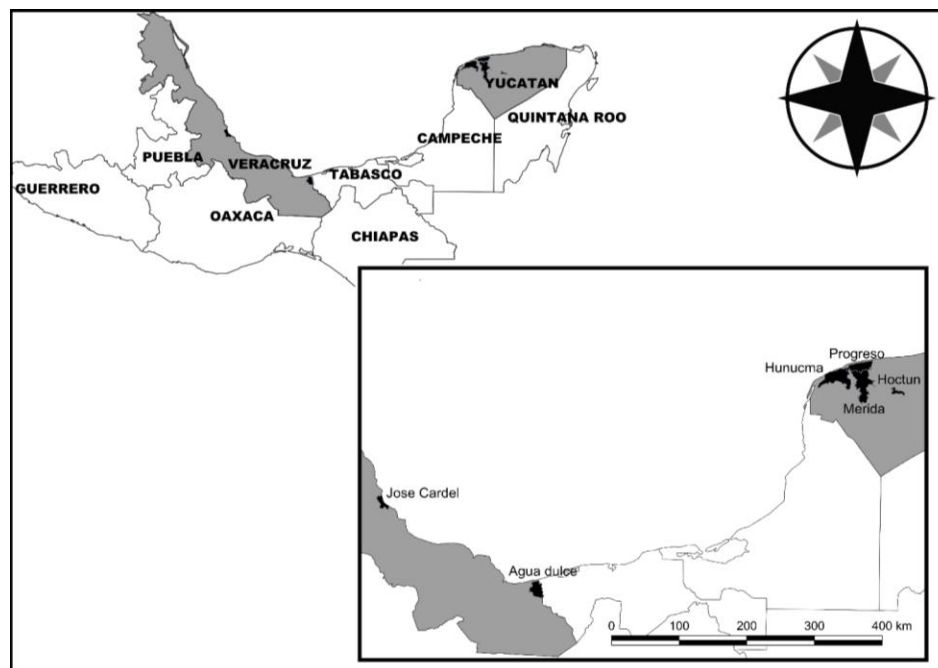


Figura 2. Poblaciones de estudio comprendidas en los estados Veracruz y Yucatán.

Tabla 3. Información geográfica de las poblaciones de mosquitos

Estado	Municipio	Localidad	Coordenadas	Altitud	Temperatura anual ° C	Habitantes
Yucatán	Mérida	Manzana	20°56' 42" N	10	26	830,732
		115	89°38'36" O	msnm		
	Progreso		21°16' 52" N	0	26	53,958
			89°39'54" O	msnm		
	Hunucmá		21°00' 58" N	10	26	30,731
			89°52'38" O	msnm		
	Hochtún		20°51' 50" N	10	26	5,697
			89°12'03" O	msnm		
Veracruz	Agua dulce	Agua	18°08' 33" N	20	26-28	46,010
		dulce	94°08'36" O	msnm		
	La antigua	José	19°22' 15" N	20	24-26	25,500
		Cardel	96°22'35" O	msnm		

Fuente: <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/mexicocifras>

## **6.2 Manejo y establecimiento de las poblaciones de *Aedes aegypti***

### **6.2.1 Cepa de referencia**

Se utilizó una cepa de referencia y susceptible New Orleans donada por el CDC de Atlanta y mantenida en condiciones de insectario por varios años sin contacto con insecticidas o cualquier otro xenobiótico, la cual se empleó como control en los bioensayos.

### **6.2.2 Establecimiento de las poblaciones bajo estudio**

Para tales fines, se colectaron inmaduros, mediante el empleo de ovitrampas y/o recolectas larvarias en las viviendas. El material biológico obtenido en campo se estableció en condiciones de insectario a  $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$  con una humedad relativa de 70-80% y un fotoperiodo de 12 h:12 h (luz: oscuridad) para la obtención de progenie, la progenie obtenida fue designada F<sub>S0</sub> (sin selección previa) en la que se llevaron a cabo los bioensayos y los ensayos moleculares y enzimáticos. Las papeletas fueron inmersas en charolas plásticas de 1.5 Lt de capacidad con agua declorada a una temperatura promedio de 28°C, las larvas obtenidas se alimentaron con una solución de hígado de bovino en polvo (Liver powder MP Biomedicals, LLC) al 50% diluido en agua. Al llegar a la etapa de pupa se colocaron en recipientes plásticos con agua dentro de jaulas entomológicas para la emergencia de los adultos los cuales se mantuvieron con solución azucarada al 10% y alimentación sanguínea para la obtención de huevos F0.

## **6.3 Insecticida**

Deltametrina calidad reactivo ((*S*)- $\alpha$ -ciano-3-fenoxibencil (1*R*, 3*R*)-3-(2, 2-dibromovinil)-2, 2- dimetilciclopropancarboxilato) al (>98%) de pureza (Chemservice, West Chester, PA). El insecticida grado reactivo se resuspendió en 1 ml de acetona grado técnico, a partir del cual se realizaron las diluciones necesarias con ayuda de la fórmula  $C_1 V_1 = C_2 V_2$ , para obtener los volúmenes y concentraciones deseadas en  $\mu\text{g}/\text{botella}$ .

#### 6.4 Bioensayos por el método de botellas del CDC

Los bioensayos de susceptibilidad se llevaron a cabo mediante el uso de botellas tipo Wheaton de 250 ml de capacidad y de acuerdo a lo descrito por Brogdon y McAllister (1998b) del Centro de Control y Prevención de Enfermedades de Atlanta, USA.

Las botellas se impregnaron adicionando el volumen necesario del insecticida y 1 ml de acetona para obtener la concentración deseada en cada botella ( $\mu\text{g}/\text{botella}$ ), se taparon y se rotaron en varias direcciones con la finalidad de recubrir toda la superficie de la botella incluyendo la tapa, posteriormente se colocó en una rotadora de botellas (WHEATON Bench Top Roller) alrededor de 30 segundo para impregnar uniformemente las paredes de la botella, transcurrido este tiempo se retiró la tapa y se dejaron rotando durante algunos segundos para la evaporación del solvente, finalmente las botellas impregnadas se resguardaron en una gaveta toda la noche protegidas de la luz.

Se realizaron bioensayos en al menos cinco diferentes concentraciones, para obtener mortalidades de entre el 9- 90%. Cada bioensayo consistió de cuatro repeticiones, tres para cada concentración y una como control o testigo, tratada solo con acetona. En cada botella se colocaron de 15-20 mosquitos hembra sin alimentación sanguínea de 1-3 días de edad durante una hora, tiempo durante el cual se observaron cada 10 minutos para registrar a los mosquitos caídos o derribados. Los criterios para determinar el estado de derribe fueron: 1) el mosquito se encuentre con el dorso en el fondo de la botella, 2) sea incapaz de volar, 3) tenga movimientos aberrantes y sea incapaz de mantenerse erguido. Posteriormente los mosquitos se transfirieron a vasos de recuperación con acceso a solución azucarada al 10% y en condiciones de laboratorio hasta las 24 horas post exposición y se realizó el registro de la mortalidad.

Con base a los resultados obtenidos se calcularon los parámetros  $CK_{50}$  (concentración *knockdown* media) y  $TK_{50}$  (tiempo *knockdown* medio) a la hora de exposición. Así como la  $CL_{50}$  (concentración letal media) a las 24 horas post exposición con el software IRMA (<http://sourceforge.net/projects/irmaproj/files/>) utilizando una regresión logística (Lozano et al. 2012). Se registraron los parámetros de susceptibilidad y de los intervalos de confianza ( $p < 0.05$ ), la pendiente de regresión desviación estándar.

Se determinó la diferencia en los parámetros de susceptibilidad entre las poblaciones estudiadas con base en el traslape de los intervalos de confianza (IC).

La mortalidad se corrigió cuando se registró mortalidad en el control mediante la fórmula Abbott (1925).

### **6.5 Nivel de resistencia cepa de campo y cepa susceptible**

Los niveles de resistencia, “factor de resistencia” (FR) o “razón de resistencia” (RR) se calcularon dividiendo la  $CL_{50}$  obtenida de la población de campo entre la  $CL_{50}$  obtenida de la cepa de referencia New Orleans. Los parámetros como:  $CK_{50}$ , y  $TK_{50}$  se calcularon de la misma manera. El estado de resistencia se determinó empleando los criterios de Mazzarri y Georghiou (1995), como baja ( $<5X$ ), media (entre 5 y  $10X$ ) y alta ( $>10X$ ).

### **6.6 Selección**

Las familias de selección se generaron de acuerdo a Saavedra et al. (2012) y Álvarez et al. (2015). La descendencia obtenida en laboratorio fue designada como  $FS_0$  (sin selección con insecticidas) sobre las cuales se llevaron a cabo los bioensayos para determinar la concentración letal cincuenta  $CL_{50}$  dicho parámetro también fue determinado para la cepa de referencia New Orleans.

La selección se realizó exponiendo  $\approx 600-1000$  mosquitos  $F_1$  entre machos y hembras, a la  $CL_{50}$  previamente calculada en la  $FS_0$  por el método de botella anteriormente descrito, en cada botella se introdujeron 20 hembras y 5 machos durante una hora de exposición, los ejemplares supervivientes a las 24 horas fueron transferidos a jaulas de cría, para su alimentación sanguínea y ibtención de progenie, nuevamente se calculó la  $CL_{50}$  de la generación  $F_1$  y dicho parámetro sirvió para la selección de la generación siguiente ( $FS_2$ ), este procedimiento se repitió sucesivamente hasta la generación de selección  $FS_4$ . En el cuadro 4, se presentan las comparaciones biológicas que se llevaron a cabo para el análisis de expresión de genes.



**Tabla 4: Líneas de *Aedes aegypti* y selección con insecticidas para comparar los perfiles de expresión.**

Hembras de la línea de campo sin selección con deltametrina F <sub>S0</sub>	Cepa de referencia New Orleans
Línea seleccionada con deltametrina F <sub>S5</sub>	Línea de campo sin selección con deltametrina F <sub>S0</sub>
Línea seleccionada con deltametrina F <sub>S5</sub>	Cepa de referencia New Orleans

## 6.7. Análisis de heredabilidad

Los valores de heredabilidad fueron estimados en todas las familias de selección para los parámetros concentración knockdown (CK<sub>50</sub>) y concentración letal cincuenta (CL<sub>50</sub>) como lo señala Saavedra et al. (2012). La heredabilidad  $h^2$  de la resistencia se determinó calculando los valores de  $h^2$  en todas las familias de selección para los parámetros *knockdown* cincuenta (CK<sub>50</sub>) y concentración letal cincuenta (CL<sub>50</sub>) como describe Tabasnik (1992). El índice de heredabilidad ( $h^2 = R/S$ ) se calcula como la proporción de la respuesta a la selección (R) al diferencial de selección (S) según la técnica de selección artificial de Falconer (1989) y está relacionado con la varianza génica aditiva para un rasgo. Un  $h^2$  bajo predice una varianza genética no aditiva para un rasgo y una respuesta pobre o muy lenta a la selección artificial, mientras que un  $h^2$  alto predice una gran varianza genética aditiva en uno o unos pocos loci que condicionan un rasgo y predice una respuesta rápida a la selección artificial.

El diferencial de selección se expresa como producto de la intensidad de selección (i) la desviación estándar fenotípica,  $S = i\sigma$ . La respuesta en cada generación se determinó como la diferencia en las medias de la población entre generaciones adyacentes con el análisis probit:  $R_t = \log \bar{X}_{t+1} - \log \bar{X}_t$ , donde  $R_t$  es la respuesta en la t-ésima generación,  $\bar{X}_t$  el valor de KC<sub>50</sub> o LC<sub>50</sub> en la t-ésima generación. La intensidad de selección se calculó a partir de la proporción de individuos sobrevivientes en la población examinada. La diferencia entre KC<sub>50</sub> o LC<sub>50</sub> se calculó en una escala logarítmica porque se suponía que el logaritmo de tolerancia se distribuía normalmente. La desviación estándar fenotípica en la generación t-ésima ( $\sigma_t$ ) se obtuvo como la

inversa de la pendiente de regresión:  $\sigma^2 = 1/bt$ . Los parámetros ( $R$ ,  $i$  y  $\sigma$ ) se determinaron en cada generación y la heredabilidad realizada se estimó como el coeficiente de regresión de las respuestas acumulativas en los diferenciales de selección acumulativa (Falconer, 1989).

## **6.8 Pruebas moleculares para determinar la frecuencia de las mutaciones V410L, V1016I y F1534C**

### **6.8.1 Extracción de ADN**

La extracción se realizó con la técnica de Coen et al., (1982). Los ejemplares fueron macerados individualmente en 50  $\mu$ l de buffer de homogenización (0.1M NaCL (Research organics), 0.2M sacarosa (Research organics), 0.1 Tris-HCL pH 9.1, 0.05M EDTA y 0.5% dodecilsulfato de sodio) utilizando pistilos Kontes y tubos eppendorf de 1.5 ml, se centrifugará a 14, 000 rpm por 1-5 minutos, este homogenizado fue incubado a 65 ° C por 30 minutos (Lab-Line), centrifugar por 30 segundos para bajar las gotas formadas, adicionalmente se agregó 15 $\mu$ L de acetato de potasio (8M), precipitar el SDS (dodecilsulfato de sodio) en hielo durante al menos 40 minutos, posteriormente se centrifugo a 14 000 rpm durante 5 minutos y 80  $\mu$ L del sobrenadante fue transferido a nuevos tubos estériles. Se agregaron 200  $\mu$ l de etanol absoluto (Jalmek) para precipitar los ácidos nucleídos, se incubaron en hielo durante al menos 10 minutos. Posteriormente el ADN fue centrifugado a 14 000 rpm durante 5 minutos y el etanol se removió cuidadosamente y cuidadosamente se añadieron 200  $\mu$ l de etanol al 70% al pellet formado, se centrifugo nuevamente a 14 000 rpm para remover el exceso de sales, el sobrenadante fue desechado cuidadosamente para no perder el pellet formado. Por último, se realizó un segundo lavado con 200  $\mu$ l de etanol al 100% para deshidratar el pellet. El pellet de ADN se secó con una plancha de baño seco, durante 1-3 minutos y se re-suspendido en 50-100  $\mu$ l de agua grado molar mili Q. El ADN se colocó en un refrigerador a 4°C para las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR). Posteriormente fue almacenado en un congelador a -20° C.

La calidad y pureza del DNA fue determinada espectrofotométricamente usando un NanoDrop 2000 (Thermo Fiser Scientific Inc, Pittsburgh, PA).

### 6.8.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La presencia y frecuencia de las mutaciones kdr F1534C y V1016I, fue determinada por PCR punto final empleando un termociclador Bio-Rad T100TM, bdH<sub>2</sub>O, master mix GoTaq® y primer alelo específicos para cada una de las mutaciones de acuerdo a lo descrito por Saavedra et al. (2007) y Yanola et al. (2011) respectivamente. La determinación de la mutación V410L se realizó de acuerdo a lo reportado por Saavedra et al. (2018).

Para I1016, se preparó un Máster mix con GoTaq® Colorless Master Mix, DNA polimerasa, agua bidestilada ultrapura en tubos Eppendprf de 1.5 ml de capacidad y los primer alelo específicos para amplificar la mutación la región IIS6 V1016I serán: Val1016F (5'-3'), [GCGGGCGGCGGGGGCGGGGCCACAAATTGTTTCCCACCCGCACCGG], Ile1016F (5'-3'), [GCGGGCACAAATTGTTTCCCACCCGCACTGA] y un primer anti sentido Ile1016R reversa (5'-3'), [TGATGAACCSGAATTGGACAAAAGC].

Se mezcló por pipeteo y se distribuyeron alícuotas 14 µl en década tubo de PCR, se añadió de 1 µl de ADN templado y se colocaron en el termociclador. Las condiciones de reacción fueron: 95°C por 5min, 29 ciclos de 95°C por 1min, 60°C por 1min, 72 ° C por 1 min 15seg, finalmente a 72°C por 10 min.

Para C1534, se utilizó un Máster mix con GoTaq® Colorless Master Mix, DNA polimerasa, agua bidestilada ultrapura en tubos Eppendprf de 1.5 ml de capacidad y los primer alelo específicos para amplificar la mutación en la región IIIS6 F1534C fueron: Cys1534+ (5'-3'), GCGGGCAGGGCGGCGGGGGCGGGGCCTCTACTTTGTGTTCTTCATCATGTG, Phe1534+ (5'-3'), GCGGGCTCTACTTTGTGTTCTTCATCATATT y 1534- Reversa (5'-3'), TCTGCTCGTTGAAGTTGTTCGAT.

Se mezcló por pipeteo el master mix, se colocaron 14 µl en cada tubo de PCR, se añadió de 1 µl de ADN templado, finalmente se colocó en el termociclador. Las condiciones de la reacción fueron: 95°C por 4 min, 39 ciclos de 95°C por 10seg, 60°C por 10seg, 72°C por 30seg, seguido de una curva de fusión de 65°C a 95°C con incrementos de 0.2°C durante 10seg.

Los primer alelo específicos para la mutación V410L fueron: V410F (5'-3'), GCGGGCAGGGCGGCGGGGGCGGGGCCATCTTCTTGGGTTTCGTTCTACCGTG,

L410F (5'-3'), GCGGGCATCTTCTTGGGTTCGTTCTACCATT, 410R (5'-3'), TTCTTCCTCGGCGGCCTCTT, la amplificación se realizó de acuerdo a la metodología estandarizada por Villanueva-Segura et al., (2019) en un termociclador tiempo real (EcoTM, Illumina, San Diego, CA, USA., con las siguientes condiciones: 95°C por 4 min, 39 ciclos de 95°C por 10seg, 60°C por 10seg, 72°C por 30seg, seguido de una curva de fusión de 65°C a 95°C con incrementos de 0.2°C durante 10seg. Los productos de PCR para las mutaciones V410L, V1016I y F1534C se confirmaron con electroforesis en gel de agarosa al 2.5%, 3 y 4%, respectivamente, y las bandas se visualizaron con un sistema análisis de imágenes de alta calidad de fluorescencia y quimioluminiscencia (UVITEC, Cambridge, Reino Unido).

Las frecuencias alélicas de las mutaciones, se calcularon dividiendo el número de mosquitos del genotipo a calcular entre el número total de mosquitos analizados, mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Frecuencia alélica} = \frac{1 (n \text{ heterocigotos}) + 2 (n \text{ homocigotos})}{2 (n \text{ mosquitos analizados})}$$

Se llevó a cabo un análisis de  $X^2$  para comprobar que las poblaciones de estudio se encuentran en equilibrio de Hardy- Weinberg, mediante la siguiente fórmula:

$X^2 = \sum (O-E)^2 / E$  donde: O son los genotipos observados y E los genotipos esperados.

El Coeficiente endogámico de Wright's FIS (1921) se calculó mediante la siguiente fórmula:  $FIS = 1 - (Hobs/Hexp)$  donde: Hobs es el número de heterocigotos observados y Hexp esperados, así mismo se estimó y llevo a cabo la corrección de wald (Agresti y Coull 1998).

## 6.9 Ensayos bioquímicos

Para cuantificar los niveles de actividad enzimática relacionada a la resistencia a insecticidas en las poblaciones, se utilizó la técnica de Brogdon et al. (1988a, 1988b). 30 mosquitos hembra fueron homogenizados individualmente en 100 µl 0.01M de buffer de

fosfato (KPO<sub>4</sub>) (pH 7.2) posteriormente se aforo a 2mL con el mismo buffer. Alícuotas de 100 µl del homogenato se distribuyeron por triplicado en microplacas de 96 pozos (Corning, USA) para cada una de las siguientes familias de enzimas: esterasas ( $\alpha$  y  $\beta$ ), Oxidasas de función múltiple (MFO), Glutation-S- transferasas (GST) y la actividad de la acetilcolinesterasa (AChE). Así mismo, se evaluó el contenido total de proteínas (PNT) tal como lo describe Brogdon (1988a, 1988b) Brogdon y Mc Allister 1997.

Las absorbancias fueron cuantificadas en un espectrofotómetro (ASYS Hitech GmbH, Eugendorf, Austria) y fueron transformadas en actividad enzimática de acuerdo a las correcciones de Valle et al. (2006) y Hemingway (1998). Controles negativo y positivo fueron utilizados en cada ensayo, de acuerdo a los descrito por Polson et al., (2011).

#### **6.9.1 Esterasas alfa y beta ( $\alpha$ y $\beta$ -EST)**

100µL de cada homogenato se distribuyó por triplicado en una microplaca de 96 pozos, 100µL solución de alfa y/o beta naftol (0.5µg/µL) fueron utilizados como control positivo y 100µL agua destilada como blancos. Se añadieron 100µL de solución de alfa-naftil acetato (alfa-naftil acetato [Sigma-Aldrich™] disuelto en acetona [CTR Scientific] y buffer fosfato [KPO<sub>4</sub>] pH 7.2) y se dejó incubar durante 20 minutos a temperatura, posteriormente se adicionaron 100µL de fast blue (O-dianizidina tetrazotizada [Sigma-Aldrich™] disuelto en agua destilada) y se dejó incubar cuatro minutos más, finalmente se leyeron las absorbancias a 540 nm. Las  $\beta$  esteras se evaluaron bajo el mismo procedimiento empleando solución de beta-naftil acetato como sustrato.

#### **6.9.2 Oxidasas de función múltiple (MFO)**

Se distribuyeron volúmenes de 100 µl del homogenato por triplicado en la microplaca de 96 pozos, 100 µl de solución de citocromo C (0.01µg/µL) (Bovine heart [Sigma-Aldrich™] disuelto en buffer acetato de sodio [Na acet 0.25 M] pH 5.0) fueron empleados como control positivo y 100µL agua destilada como blancos. Se añadieron 200 µl de solución de TMBZ (3,3,5,5-tetrametil-benzidina dihidroclorada [Sigma-Aldrich™] disuelta en metanol [Jalmek] y buffer acetato de sodio [Na acet 0.25 M] pH

5.0) a cada pozo y 25 µl de peróxido de hidrógeno al 3% (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) [Jalmek]. Se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente y se leyó a 620nm.

### **6.9.3 Glutation S-transferasas (GST)**

Se distribuyeron 100µL del homogenato por triplicado en una microplaca, no hay control positivo para este ensayo por lo que seis pozos fueron preparados con 100 µl de agua destilada como blancos. Se agregó 100 µl de glutatión reducido (GSH) [Sigma-Aldrich™] y 100 µl 1cloro-2,4 dinitrobenzeno (CDNB) [Sigma-Aldrich™] y se realizaron lecturas a una longitud de onda de 340 nm inmediatamente (T0) y después de 10 minutos de incubación (T10). Los datos obtenidos como resultado sustraer la lectura inicial (T0) a la lectura de 10 minutos (T10), fueron utilizados para el análisis estadístico.

### **6.9.4 Acetil colinesterasa (AChE) y acetil colinesterasa insensible (iAChE)**

Para evaluar la actividad de la acetilcolinesterasa AChE se distribuyeron los siguientes volúmenes: 100µL del homogenato por triplicado, se agregó 100 µl del sustrato ATCH (acetilcolina yodada [Sigma-Aldrich™] disuelto en acetona y buffer fosfato [KPO4] pH 7.2) y 100 µl de DTNB (ácido ditio-bis-2nitrobenzoico [Sigma-Aldrich™] disuelto buffer fosfato [KPO4] pH 7.2) Se realizaron las lecturas a 414 nm inmediatamente (T0) y después de 20 min de incubación a temperatura ambiente (T20).

Se llenó una segunda microplaca con 100µL del homogenato por triplicado, ahora fueron añadidos 100 µl del sustrato ATCH conteniendo el inhibidor propoxur (Chem Service) al 2% (acetilcolina yodada-propoxur disuelto en acetona y buffer fosfato [KPO4] pH 7.2) y 100 µl de DTNB (ácido ditio-bis-2nitrobenzoico [Sigma-Aldrich™] disuelto buffer fosfato [KPO4] pH 7.2). Las lecturas se realizaron a 414 nm inmediatamente (T0) y 20 min después de incubar a temperatura ambiente (T20).

### **6.9.5 Cuantificación de proteínas totales (PTN)**

Se colocaron 20µL del homogenato por triplicado en una microplaca, 20 µL de solución de BSA (1µg/µL) fueron utilizados como control positivo y 20 µL de agua

destilada como blancos, se agregaron 80  $\mu$ l de buffer fosfato ([KPO<sub>4</sub>] pH 7.2) y 200  $\mu$ l de solución reactivo de proteína Bio-Rad 1:5. Se leyó a 620 nm inmediatamente.

## **6.10 Curvas de calibración**

### **6.10.1 Esterasas alfa y beta ( $\alpha$ y $\beta$ -EST)**

Para poder corregir y expresar los valores medios de absorbancia en actividad enzimática, se generaron curvas de calibración siguiendo los procedimientos antes descritos para el ensayo con esterazas empleando una solución testigo de alfa-naftol y beta-naftol [Sigma-Aldrich™] con concentraciones de 0.3 a 5  $\mu$ g/ $\mu$ L y de 0.5 a 4  $\mu$ g/ $\mu$ L respectivamente, los datos de las absorbancias fueron sometidos a una regresión lineal simple para obtener el factor de conversión.

### **6.10.2 Oxidasas de función múltiple (MFO)**

Para generar la curva estándar se utilizó la misma solución de citocromo *C* y el ensayo se corrió como se describe en el apartado previo, el rango de concentraciones utilizado para la regresión lineal simple va de 0.002 a 0.65  $\mu$ g/ $\mu$ l citocromo *C*.

### **6.10.3 Proteínas totales (PTN)**

Para poder expresar en actividad enzimática los valores medios de absorbancia obtenidos para cada familia de enzimas es necesario corregir por la cantidad total de proteínas contenida en el insecto. Por lo cual se generó una curva de calibración con solución testigo de BSA utilizando un rango de concentraciones de 0.1 a 6.5  $\mu$ g/ $\mu$ L, el ensayo se corrió siguiendo los procedimientos antes descritos en el ensayo del contenido total de proteínas.

## **6.11 Corrección de los valores medios de absorbancia y su transformación en actividad enzimática**

Se creó una base de datos en Excel con las absorbancias obtenidas, inicialmente se sacó el coeficiente de variación entre las réplicas por insecto, se determinó el valor

medio de absorbancia y la actividad se corrigió de acuerdo a los parámetros establecidos por Valle et al. (2006) y Hemingway (1998), las correcciones se describen a continuación para cada familia de enzimas:

#### **6.11.1 Esterasas alfa y beta ( $\alpha$ y $\beta$ -EST)**

Los valores medios de absorbancia fueron corregidos por el volumen total del homogenizado multiplicando por el factor 20, se transformó a nmol con el factor de conversión obtenido en la curva sustituyendo los valores medios de absorbancia en “y” y restándoles la división del *intercepto* sobre la *pendiente*  $x = y - a/b$ , también se corrigió con el tiempo total de la reacción (nmol/24) y finalmente se corrigió dividiendo entre la cantidad total de proteínas en el mosquito (nmol/mgPNT/min).

#### **6.11.2 Oxidasas de función múltiple (MFO)**

Los valores medios de absorbancia fueron corregidos por el volumen total del homogenizado multiplicando por el factor 20, se transformaron  $\mu\text{g}$  Cyt con el factor de conversión obtenido en la curva sustituyendo los valores medios de absorbancia en “y” y restándoles la división del *intercepto* sobre la *pendiente*  $x = y - a/b$ , finalmente se corrigió por la cantidad total de proteínas en el mosquito ( $\mu\text{g}$  Cyt/mgPNT).

#### **6.11.3 Glutation S-transferasas (GST)**

En el caso de las GST no fue posible construir una curva estándar, sin embargo, en este caso se calculó la cantidad de sustrato utilizada en la reacción de acuerdo a los parámetros de Hemingway (1998).

Los valores de absorbancia fueron transformados asumiendo que dichos valores siguen la ley de Beer's con la siguiente fórmula:

$$A = \epsilon cl$$

Donde:

A= Valor de Abs ( $T_{10}-T_0$ )

$\epsilon$  = Coeficiente de extinción

c= Concentración

l= Distancia



La distancia está en función del volumen de solución contenida en el pozo, 0.6 cm es la distancia determinada en un vol. de 210 µl a 340nm. Siendo que la capacidad máxima del pozo en la placa es de 360 µl en 1.7 cm, tenemos que para un vol. de 300 µl utilizado en este ensayo, la distancia es de 0.89. El volumen total de homogenizado y el tiempo también fueron considerados, por lo tanto:

$$c = A * 20 / \epsilon l * 10$$

$$c = ((\text{AbsT10} - \text{AbsT0}) \times 20) / (4.39 * 0.6 * 10)$$

Donde:

A= Valor de Abs (T10-T0)

$\epsilon$  = Coef de extinción (4.39)

l= Distancia (0.89)

20 en el dividendo= volumen total de homogenato

10 en el divisor= minutos de reacción

Finalmente se corrigió por el contenido total de PNT (mmol/ mgPNT/min)

#### **6.11.4 Acetilcolinesterasa (AChE)**

Los resultados fueron expresados en % de actividad remanente como resultado de dividir la absorbancia en presencia del inhibidor propoxur (placa de iAChE) entre la absorbancia en ausencia (placa AChE):

$$(\text{AChI}_{T20} / \text{AChE}_{T20}) * 100$$

#### **6.11.5 Proteínas totales (PTN)**

Primeramente, se corrigió por el volumen total de homogenato multiplicando por 100, se transformó a µg de PTN con el factor de conversión obtenido en la curva  $x = \text{Abs} - a/b$ , finalmente transformó en mg de PTN (µg de PTN/1000). Las correcciones se describen a continuación:

#### **6.11.6 Análisis estadístico**

Los valores medios de actividad fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA,  $p < 0.05$ ) y una comparación múltiple de medias por Tukey ( $p < 0.05$ ), así mismo, se verificó la normalidad de la varianza por la prueba de Bartlett con el paquete estadístico GraphPadPrism (GraphPad Software, Inc, Versión 6.01, La Jolla, CA, USA. graphpad.com). Se determinó el p99 correspondiente a la cepa de referencia New Orleans para cada enzima en la generación parental ( $F_{S0}$ ) y cada generación de selección ( $F_{S1}$ - $F_{S5}$ ) y se calculó el porcentaje de individuos con actividad enzimática por encima de ese valor se calculó para cada población.

La actividad media enzimática fue clasificada como no alterada (NA) cuando el porcentaje de individuos bajo estudio no excedía el percentil 99 de la cepa de referencia al menos en un 15% (NA). Incipientemente alterado (IA) si al menos entre 15 y 50% de los individuos excedía el percentil 99 y alterado (A) cuando este porcentaje excedía el 50%, de acuerdo al criterio establecido por Montella et al., (2007).

### **6.12 RNA-seq**

#### **6.12.1 Extracción total de RNA**

Pools de 3 a 5 mosquitos fueron macerados en 100µl de buffer de extracción, fueron incubadas a 42°C durante 30 minutos, periodo durante el cual se prepararon las columnas de purificación [250µl de buffer de acondicionamiento (Conditioning buffer) fueron añadidas a cada columna y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos, posteriormente fueron centrifugadas un minuto a 16,000 rcf], posteriormente las muestras fueron centrifugadas 2 minutos a 14, 000 rcf, el sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo y se añadieron 100 µl de etanol, se mezcló por pipeteo y se transfirieron a las columnas de acondicionamiento previamente etiquetadas. Las columnas de acondicionamiento fueron centrifugadas a 100rcf durante dos minutos, inmediatamente fueron centrifugadas a 16, 000 rcf durante 30 segundos para bajar todo el sobrenadante.

Los filtros de las columnas fueron transferidos a tubos nuevos previamente rotulados, para su purificación con el kit DNase treatment (RNase and DNase free)

QIAGEN añadiendo 40 µl de la solución (5µl DNase/35µl buffer RDD) y se dejó incubar 15 minutos a temperatura ambiente, transcurrido el tiempo de incubación se añadieron 40µl de buffer de lavado I y se centrifugo 1 800rcf por un minuto.

Se realizaron dos lavados más, añadiendo 100µl de buffer de lavado II y se centrifugaron durante un minuto a 800 rcf, se añadieron 100µl de buffer de lavado II nuevamente y se centrifugaron a 16, 000 rcf durante 3 minutos. El sobrenadante fue descartado y las muestras se centrifugaron nuevamente a por un minuto a 16,000 rcf, las columnas fueron transferidas a tubos de 0.6 ml, se añadieron 30µl de buffer de elución se incubaron durante 3 minutos. Finalmente se centrifugaron a 16, 000 rcf.

### **6.12.2 Cuantificación del RNA total**

La concentración, calidad e integridad del RNA fueron analizados por un bioanalizador Agilent 4200 TapeStation con el kit RNA ScreenTape, añadiendo 5µl del buffer ScreenTape, 1µl de la muestra de RNA, se pasó por vortex IKA a 2,000rpm, se centrifugo por spin por unos segundos, se incubaron a 72°C para su alineamiento durante 3 minutos, posteriormente en hielo durante 2 minutos, nuevamente se pasó por spin para bajar lo condensado y finalmente se verificó en el bioanalizador (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Las muestras fueron almacenadas a -80°C.

### **6.12.3 Purificación del RNA**

Se verificó la concentración de RNA y se calculó el volumen necesario para obtener una concentración de 2mg por muestra. Los remanentes de ADN fueron removidos con el kit de eliminación Baseline-ZERO™ DNase (Epicentre, Illumina) añadiendo 2µl de 10X Baseline-ZERO DNase de Buffer de reacción a la muestra, seguidamente se añadió 1µl de enzima de digestión (1 MBU) Baseline-ZERO DNase, las muestras fueron incubadas a 37°C por 15-30 minutos, para inactivar la enzima de digestión fueron añadidos 2 µl de DNase stop solución a cada muestra y fueron incubadas a 65°C por 10 min.

#### 6.12.4 Eliminación de RNAr

El RNA ribosomal se removió con el kit Ribo-Zero™ rRNA removal kit (Human/Mouse/Rat) (Epicentre, Illumina).

*Lavado de perlas magnéticas.* Las perlas magnéticas se resuspendieron gentilmente con vortex, se distribuyeron alícuotas de 225 µl en tubos de 1.5 mL para cada muestra, estos se colocaron en una gradilla magnética con la tapa abierta, transcurridos 2 minutos el sobrenadante se removió y se descartó cuidando no remover el pellet formado, los tubos se retiraron de la gradilla magnética, se añadieron 225 µl de agua ultrapura (RNase Free water) y se pasó por vortex (este procedimiento se realizó dos veces), los tubos se colocaron en la gradilla magnética con las tapas abiertas entre un lavado y otro, y se descartó el sobrenadante. Posteriormente se añadieron 65 µl de solución de resuspensión (Ribo-Zero Magnetic Bead Resuspension Solution) y se homogenizó cuidadosamente con vortex, se añadió un µl de Ribo Guard RNase inhibitor a cada tubo y se mezcló por pipeteo, las perlas se reservaron a temperatura ambiente hasta su uso.

*Tratamiento de la muestra con Ribo-Zero rRNA removal solution.* Se utilizaron tubos para PCR de 0.2mL y se añadió a cada tubo en el orden que se describe, 5 µl de agua ultrapura, 4 µl de buffer (Ribo-Zero reaction buffer), 23 µl de muestra con RNA y 8µl de solución removedora (Ribo-Zero removal sol.), se mezcló por pipeteo, y se dejó incubando a 68 °C por 10 minutos, transcurrido este tiempo se retiraron y se pasaron por centrifuga manual para recuperar lo condensado y se dejó a T ambiente 5 minutos.

*Reacción con perlas magnéticas y eliminación del RNAr.* El RNA tratado se transfirió a tubo de 1.5 mL, se añadieron 65 µl de perlas magnéticas y se mezcló por pipeteo vortex diez segundos, se dejaron incubando a T ambiente 5 minutos, se mezcló nuevamente con vortex a baja velocidad por cinco segundos y se dejó incubando a 50°C en el baño seco durante cinco minutos, transcurrido este periodo de incubación se transfirieron inmediatamente a las gradillas magnéticas y se dejó hasta que la solución se tornó transparente. El sobrenadante (85-90µl) se transfirió a tubos nuevos libres de RNA's cuidando no llevar perlas magnéticas. Las muestras fueron colocadas en hielo y se procedió a la purificación con el kit (Ribo-Zero treated RNA).

*Purificación del RNA.* Las muestras se colocaron a T ambiente durante 2 minutos, 160µl del mix AMPure fueron añadidos a cada tubo de 1.5mL que contiene el rRNA extraído y se mezcló por pipeteo. Las muestras se dejaron incubando a temperatura ambiente durante 15 minutos, posteriormente se colocaron en la gradilla magnética hasta que la solución se tornó clara, se retiró y descartó el sobrenadante. Posteriormente se añadieron 200µl de etanol al 80%, se dejó incubando 30 segundos, el sobrenadante se removió y se descartó. Este procedimiento se realizó dos veces. Las muestras se dejaron secando a T ambiente en la gradilla magnética. Posteriormente se añadieron 11µl de agua libre de RNA's del kit ScriptSeq™, se homogenizo por pipeteo y se dejó incubando dos minutos a T ambiente fuera de la gradilla magnética. Se colocó nuevamente en la gradilla magnética y se dejó el tiempo necesario para que la solución se torne transparente. EL sobrenadante que contiene el RNA purificado fue transferido a tubos nuevos y se colocó en hielo inmediatamente hasta su uso.

#### **6.12.5 Preparación de las librerías**

*Síntesis de cDNA.* El proceso de síntesis de cDNA se realizó en dos pasos: cDNA 1 añadiendo 3 µl de cDNA síntesis Premix, 0.5µl 100mM DTT, 0.5 µl starScript AMV reverse Transcriptase. Se añadieron 4µl de cDNA síntesis Master Mix a cada reacción y se incubaron a 25°C por cinco min, seguido de 42°C por 20 min, finalmente se pauso a 37°C, se añadió un µl de finishing solution y se regresó al termociclador bajo las siguientes condiciones: 37°C por 10 min, seguido de 95°C por 3 min, un periodo de enfriamiento a 25°C en espera.

*Síntesis 3'-Tagged DNA.* Se añadieron 8µl de Master Mix (7.5 µl de Terminal Tagging Premix, más 0.5µl DNA polimerasa) por reacción y se incubó a 25°C por 15 minutos, seguido de un periodo de 95°C por 3 minutos y finalmente a 4°C en espera.

*Purificación del cDNA.* Las reacciones fueron trasferidas a tubos de 1.5mL, se añadieron 45µl de perlas magnéticas (AMPure XP) a cada reacción, se homogenizo por pipeteo, y se incubo a temperatura ambiente por 15 minutos, posteriormente se colocaron en la gradilla magnética durante cinco minutos, el sobrenadante se removió cuidadosamente y se descartó. 200 µl de etanol al 80% fueron añadidos sin remover las perlas, se dejó incubando 30 segundos, y se removió el sobrenadante, este procedimiento

se realizó dos veces, se removió el etanol y se dejó secar a temperatura ambiente 15 minutos. Se resuspendió en 24.5 µl de agua libre de nucleasas, se homogenizó por pipeteo, y se incubaron a temperatura ambiente por dos minutos, se colocaron una vez más en la gradilla magnética durante cinco minutos, se transfirieron 22.5µl del sobrenadante a tubos nuevos de 0.2 mL y se procedió a la amplificación de la librería.

*Amplificación de la librería RNAseq (Barcode).* Para la amplificación de la PCR se asignaron primer específico para cada muestra. A cada tubo de PCR se añadieron 22.5µl de ditagget cDNA, 1µl de forward PCR, 1µl de reverse PCR primer (ScriptSeq Index PCR primer), 25 µl de FailSafe PreMix E, 0.5µl FailSafe PCR enzyme (1.25U), la PCR se corrió bajo las siguientes condiciones: 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 68°C por 3 minutos, finalmente se dejó a 68 °C durante 7 minutos.

#### **6.12.6 Purificación de la librería de RNA**

Las reacciones se transfirieron a tubo nuevos de 1.5mL, se añadieron 50 µL de perlas magnéticas (AMPure XP) a cada tubo y se mezcló por pipeteo, se dejaron incubando 15 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se colocaron en la gradilla magnética durante cinco minutos, se removió y descartó el sobrenadante, se añadieron 200µl de etanol al 80% y se incubó a temperatura ambiente durante 30 segundos y se descartó el sobrenadante, este paso se realizó dos veces, posteriormente se dejó secar a temperatura ambiente 15 minutos, se añadieron 20 µl de agua libre de nucleasas (Nuclease free water), se homogenizo por pipeteo y se dejó incubar 2 minutos, trascurrido este tiempo se colocaron en la gradillas magnética y se dejaron cinco minutos hasta que la solución se tornó transparente. Finalmente, el sobrenadante que contiene la librería se transfirió a tubos apropiados y se procedió a cuantificar la calidad y cantidad en TapeStation.

Finalmente, las muestras fueron secuenciadas en un Illumina HiSeq 2500, en las instalaciones núcleo de biotecnológica del Centro para la Prevención y Control de las Enfermedades (CDC) de Atlanta, EE.UU.

## **6.13 Análisis de expresión diferencial**

### **6.13.1 Anotación de genes**

Las secuencias obtenidas fueron cortadas y alineadas con el programa con Trimmomatic (Bolger, 2014) usando como referencia el genoma ensamblado de *Ae. aegypti* más actual AaegL5.2 Para eliminar el efecto de ruido (falso positivo) se calculó la probabilidad de falso positivo (FDR) y doble cambio.

### **6.13.2 Normalización**

Para el análisis de expresión se promediaron las lecturas obtenidas en cada replica biológica de los diferentes enfoques. El promedio de las lecturas fue sometido a protocolos de depurado y normalización de acuerdo a lo sugerido por (Law et al. 2018), por medio del uso de los paquetes limma3.40.0 (Ritchie et al. 2015) y edgeR3.24.3 (Robinson et al. 2010). Explicado brevemente, se transformaron los datos de expresión a lecturas por millón y de estos se obtuvo su valor en logaritmo de 2 (log-CPM), descartando así aquellos genes que presenten un nivel de expresión debajo del valor mínimo de log-CPM por cada muestra. La normalización de datos entre los enfoques se llevó a cabo por medio del método Trimmed Mean of M-values (TMM).

### **6.13.3 Análisis estadístico de la expresión diferencial**

Se eligió un modelo lineal generalizado y se determinaron los genes diferencialmente expresados por método empírico de Bayes, considerando un fold change (FC) mínimo de 2 entre los contrastes aplicados y un adj. P value <0.05, y un P 0.001 de acuerdo a lo descrito por (Law et al. 2018). Se utilizaron sus valores de expresión (Log-CPM) para la realización de gráficos de mapas de calor por medio de los paquetes de desarrollo de gráficos heatmaply (Galili et al. 2017), Glimma (Su et al. 2017) y R Color Brewer (Neuwirth 2014).

### **6.13.4 Descripción de funciones ontológicas**

Finalmente se realizó una prueba de riqueza de aquellos genes diferencialmente expresados y compartidos entre las poblaciones la generacion basla  $F_{S0}$  (sin seleccionar)

las poblaciones seleccionadas con deltametrina  $F_{S4}$  mediante vía blast2GO. Consecuentemente los resultados fueron agrupados por categorías de acuerdo a la función biológica.



## 7. RESULTADOS

### 7.1 Pruebas de susceptibilidad

Cinco de las poblaciones analizadas fueron altamente resistentes al piretroide deltametrina en la generación basal según la  $CL_{50}$  ( $RRCL_{50} > 10X$ ), y solo una población mostró resistencia moderada ( $RRCL_{50}$  5-10X). Asimismo, se obtuvieron valores altos de  $RRCK_{50}$  en dos poblaciones, y tres mostraron resistencia moderada, sólo una mostró resistencia baja. Estos resultados sugieren que la resistencia a la deltametrina está bien establecida en estas poblaciones (Tablas 5, 6 y Figura 3).

Al comparar la  $CL_{50}$  de las poblaciones de campo respecto a la cepa susceptible en la generación basal, cinco de las poblaciones (Mérida, Progreso, Hochtun, Agua dulce y Jose Cardel) fueron resistentes a deltametrina con valores  $RRCL_{50}$  entre 18-134X, solamente una (Hunucma), mostró moderada resistencia ( $RRCL_{50}$  5-10X) (Tabla 6). Así mismo, se obtuvieron valores  $RRCK_{50}$  altos en dos poblaciones Mérida  $RRCK_{50}$  20 veces y José Cardel  $RRCK_{50}$  14 veces, tres presentaron moderada resistencia Progreso, Hochtun y Agua dulce  $RR_{KC50}$  entre 5-9 veces y solamente una presentó baja resistencia Hunucma  $RR_{KC50}$  3 veces en la generación basal (Tabla 5).

Cuando se seleccionaron las poblaciones con deltametrina, el aumento en  $CL_{50}$  no fue significativo para  $F_{S1}$  y  $F_{S2}$  para la cepa de Mérida (basado en la superposición de IC del 95%). Sin embargo, hubo un aumento significativo en  $CL_{50}$  de  $F_{S1}$  a  $F_{S5}$  en todas las demás cepas de *Ae. aegypti* (Tabla 6). En el caso de  $KC_{50}$ , el aumento fue significativo entre todas las generaciones de selección ( $F_{S1}$ - $F_{S5}$ ) para las cepas Progreso, Agua Dulce y José Cardel, pero no fue significativo para las cepas Mérida y Hunucma para  $F_{S1}$ - $F_{S2}$  y la cepa Hochtun para  $F_{S1}$  - $F_{S3}$  (Tabla 5).

Al comparar los valores de  $CL_{50}$  y  $CK_{50}$  para la última generación seleccionada de deltametrina ( $F_{S5}$ ) versus la generación parental ( $F_{S0}$ ), observamos un aumento de ~ 1.5 - 5.5 veces para  $CL_{50}$  y ~ 1.4-2.7 veces para  $CK_{50}$  en todas las cepas (Figura 3).

Los resultados revelaron que la resistencia a la deltametrina aumentó en respuesta a la presión de selección (Tablas 5, 6 y Figura 3). El valor de la relación de resistencia a la caída ( $RRCK_{50}$ ) aumentó de 20 a 38 veces de  $F_{S0}$ - $F_{S5}$  en la cepa de Mérida, ~ 4 veces para Progreso (6 a 23 veces), 2.6 veces para Hunucma (3 a 8 veces), 2

veces (5 a 10 veces) en Hoctun y se observaron ligeros aumentos en las cepas de Agua Dulce y José Cardel con 9 a 12 veces y 14 a 22 veces, respectivamente.

**Table 5. Concentraciones *knockdown* (CK<sub>50</sub> y CK<sub>90</sub> a deltametrina y factor de resistencia (FR) para hembras de *Ae aegypti* en la generación basal y las generaciones de selección.**

Población		<i>n</i>	CK µg/B			FR	
			CK <sub>50</sub> (IC)	CK <sub>90</sub> (IC)	<i>b</i> ± DE	CK <sub>50</sub>	CK <sub>90</sub>
Mérida	F <sub>S0</sub>	345	1.85 (1.69-2.03)	3.89 (3,27-4.63)	2.95 (0.35)	20	8
	F <sub>S1</sub>	403	1.62 (1.45-1.82)	4.65 (3.62-5.97)	2.09 (0.21)	18	10
	F <sub>S2</sub>	525	1.85 (1.63- 2.09)	6.75 (4.88- 9.33)	1.69 (0.19)	20	14
	F <sub>S3</sub>	540	2.42 (2.04- 2.85)	15.19 (14.58- 21.80)	1.19 (0.10)	27	33
	F <sub>S4</sub>	440	2.55 (2.17-3.0)	12.79 (9.01- 18.16)	1.36 (0.13)	28	27
	F <sub>S5</sub>	400	3.44 (2.93-404)	14.84 (10.88-20.23)	1.50 (0.15)	38	32
Progreso	F <sub>S0</sub>	490	0.54 (0.45-0.64)	3.22 (2.26-4.60)	1.23 (0.11)	6	7
	F <sub>S1</sub>	526	0.67 (0.60-0.79)	3.00 (2.25- 3.99)	1.50 (0.13)	7	7
	F <sub>S2</sub>	417	1.78 (1.53- 2.07)	7.13 (4.84-10.50)	1.58 (0.18)	20	15
	F <sub>S3</sub>	395	1.57 (1.34- 1.85)	7.04 (4.93- 10.03)	1.47 (0.15)	17	15
	F <sub>S4</sub>	439	2.13 (1.88- 2.40)	7.36 (5.47- 9.91)	1.77 (0.19)	23	16
	F <sub>S5</sub>	320	1.46 (1.27- 1.68)	5.63 (4.57-6.93)	2.02 (0.22)	23	13
Hunucmá	F <sub>S0</sub>	355	0.34 (0.28-0.40)	1.42 (1.03-1.96)	1.16 (0.09)	3	3
	F <sub>S1</sub>	460	0.25 (0.21- 0.29)	1.25 (0.88- 1.76)	1.37 (0.12)	3	3
	F <sub>S2</sub>	597	0.33 (0.27- 0.40)	3.27 (2.13- 5.01)	0.96 (0.08)	4	7
	F <sub>S3</sub>	353	1.14 (0.90- 1.45)	10.19 (5.53- 18.80)	1.00 (0.12)	13	22
	F <sub>S4</sub>	220	1.16 (1.06-1.26)	1.93 (1.69- 2.20)	4.30 (0.62)	13	4
	F <sub>S5</sub>	180	0.75 (0.61-0.91)	2.26 (1.62-3.16)	1.98 (0.33)	8	5
Hoctún	F <sub>S0</sub>	535	0.48 (0.41-0.56)	1.85 (1.48-2.32)	1.63 (0.14)	5	4
	F <sub>S1</sub>	535	0.23 (0.19-0.27)	1.32 (0.97-1.80)	1.35 (0.10)	2	3
	F <sub>S2</sub>	470	0.48 (0.38-0.61)	5.73 (3.47-9.46)	0.88 (0.08)	5	12
	F <sub>S3</sub>	508	0.57 (0.48-0.67)	2.92 (2.13-3.99)	1.34 (0.12)	6	6
	F <sub>S4</sub>	380	0.75 (0.65-0.86)	2.61 (1.92-3.56)	1.76 (0.23)	8	6
	F <sub>S5</sub>	440	0.94 (0.79- 1.12)	4.19 (3.09- 5.66)	1.47 (0.14)	10	9
Agua Dulce	F <sub>S0</sub>	536	0.80 (0.76-0.84)	1.44 (1.30-1.60)	3.73 (0.30)	9	3
	F <sub>S1</sub>	480	1.06 (1.01-1.12)	1.80 (1.62-2.01)	4.15 (0.38)	12	4
	F <sub>S2</sub>	333	1.08 (1.00-1.16)	1.99 (1.70- 2.33)	3.58 (0.45)	12	4
	F <sub>S3</sub>	313	1.06 (0.97-1.15)	2.06 (1.74- 2.44)	3.32 (0.38)	12	4
	F <sub>S4</sub>	397	1.14 (1.05-2.03)	2.42 (2.03- 2.89)	2.92 (0.32)	13	5

	F <sub>S5</sub>	440	1.09 (1.02- 1.17)	2.04 (1.79-2.33)	3.53 (0.34)	12	5
José Cardel	F <sub>S0</sub>	420	1.26 (1.21-1.34)	2.18 (1.95-2.48)	4.01 (1.18)	14	5
	F <sub>S1</sub>	429	1.47 (1.33- 1.64)	4.10 (3.28- 5.12)	2.15 (0.20)	16	9
	F <sub>S2</sub>	499	1.63 (1.51-1.75)	3.73 (3.08- 4.50)	2.65 (0.28)	18	8
	F <sub>S3</sub>	400	1.68 (1.53- 1.85)	4.07 (3.35-4.95)	2.48 (0.24)	19	9
	F <sub>S4</sub>	400	1.98 (1.74-2.24)	6.68 (5.03- 8.86)	1.80 (0.19)	22	14
	F <sub>S5</sub>	360	2.01 (1.79- 2.26)	5.68 (4.35- 7.42)	2.12 (0.23)	22	12
Cepa susceptible		492	0.09 (0.08-0.11)	0.46 (0.32-0.65)	1.43 (0.13)	-	-

<sup>a</sup> n: tamaño de muestra

<sup>b</sup> b: Pendiente de la regression lineal Probit-log,  $\pm$  error estándar

<sup>c</sup> CL: concentraciones letales 50% y 90% en microgramos per botella, intervalos de confianza 95%

<sup>d</sup> FR: Factor de resistencia CL<sub>50</sub> población de campo/ CL<sub>50</sub> población susceptible

**Tabla 6. Concentración letal (CL<sub>50</sub> y CL<sub>90</sub>) a deltametrina y factor de resistencia (FR) para hembras de *Ae aegypti* en la generación basal y las generaciones de selección (F<sub>S0</sub>- F<sub>S5</sub>).**

Población		N	LC µg/B			FR	
			CL <sub>50</sub> (IC)	CL <sub>90</sub> (CI)	b ± DE	CL <sub>50</sub>	CL <sub>90</sub>
Mérida	F <sub>S0</sub>	466	5.35 (4.73- 6.56)	42.11 (27.77-63.84)	1.06 (0.09)	134	140
	F <sub>S1</sub>	584	5.60 (5.02- 6.24)	18.63 (15.07-23.03)	1.82 (0.15)	140	62
	F <sub>S2</sub>	525	5.80 (5.16- 6.49)	19.32 (19.96-30.27)	1.82 (0.18)	145	64
	F <sub>S3</sub>	520	7.87 (7.03- 8.82)	24.58 (19.96- 30.27)	1.93 (0.17)	196	82
	F <sub>S4</sub>	501	7.73 (6.93- 8.61)	24.15 (19.69- 29.62)	1.92 (0.17)	193	80
	F <sub>S5</sub>	389	7.88 (6.91-9.00)	26.31 (19.84- 34.89)	1.82 (0.21)	197	87.7
Progreso	F <sub>S0</sub>	650	0.75 (0.59- 1.06)	7.06 (4.83-10.31)	0.97 (0.08)	18	23
	F <sub>S1</sub>	473	1.06 (0.86- 1.29)	7.72 (5.21-11.44)	1.10 (0.09)	26	26
	F <sub>S2</sub>	415	1.71 (1.45- 2.01)	7.19 (5.30- 9.76)	1.53 (0.15)	43	24
	F <sub>S3</sub>	458	2.37 (2.08- 2.71)	8.97 (6.74- 11.95)	1.65 (0.15)	59	30
	F <sub>S4</sub>	461	2.06 (1.86- 2.28)	5.63 (4.57-6.93)	2.18 (0.20)	51	19
	F <sub>S5</sub>	320	1.66 (1.46-1.88)	4.32 (3.23-5.78)	2.02 (0.22)	36	14
Hunucmá	F <sub>S0</sub>	424	0.25 (0.20- 0.29)	1.43 (0.99-2.05)	1.24 (0.12)	6	5
	F <sub>S1</sub>	359	0.69 (0.53- 0.78)	3.50 (2.32-5.28)	1.30 (0.14)	17	12
	F <sub>S2</sub>	497	0.80 (0.69- 0.93)	3.63 (2.68-4.91)	1.45 (0.14)	20	12
	F <sub>S3</sub>	299	1.16 (1.01- 1.33)	3.61 (2.69- 4.83)	1.93 (0.23)	29	12
	F <sub>S4</sub>	260	1.33 (1.16- 1.52)	3.26 (2.62- 4.04)	2.45 (0.26)	33	11
	F <sub>S5</sub>	318	1.36 (1.19-1.56)	4.29 (3.20- 5.75)	1.92 (0.22)	34	14

Hoctún	F <sub>S0</sub>	532	1.30 (1.15- 1.46)	4.06 (3.25-5.08)	1.92 (0.16)	32	13
	F <sub>S1</sub>	416	2.50 (2.23- 2.79)	6.67 (5.51-8.07)	2.23 (0.22)	62	22
	F <sub>S2</sub>	467	3.27 (3.01- 3.55)	7.43 (6.28-8.78)	2.67 (0.27)	82	23
	F <sub>S3</sub>	417	2.76 (2.52- 3.02)	6.60 (5.45- 8.00)	2.52 (0.26)	69	22
	F <sub>S4</sub>	457	2.67 (2.45- 2.92)	6.51 (5.36- 7.89)	2.47 (0.26)	67	22
	F <sub>S5</sub>	359	2.07 (1.89- 2.27)	4.37 (3.72- 5.13)	2.94 (0.33)	52	15
Agua Dulce	F <sub>S0</sub>	475	1.00 (0.91- 1.09)	2.62 (2.14-3.21)	2.27 (0.21)	25	7
	F <sub>S1</sub>	540	1.41 (1.31- 1.52)	3.15 (2.65-3.75)	2.74 (0.24)	32	10
	F <sub>S2</sub>	420	2.02 (1.81- 2.25)	5.51 (4.49-6.78)	2.18 (0.21)	50	18
	F <sub>S3</sub>	457	2.12 (1.90- 2.35)	6.19 (4.91- 7.73)	2.05 (0.19)	53	20
	F <sub>S4</sub>	519	2.03 (1.86- 2.22)	5.32 (4.40- 6.44)	2.28 (0.20)	51	18
	F <sub>S5</sub>	340	1.95 (1.74- 2.20)	6.40 (4.79- 8.55)	1.85 (0.19)	49	21
José Cardel	F <sub>S0</sub>	481	1.64 (1.46- 1.83)	5.22 (4.10- 6.64)	1.89 (0.18)	41	6
	F <sub>S1</sub>	531	2.30 (2.12- 2.49)	5.33 (4.53- 6.28)	2.61 (0.25)	57	18
	F <sub>S2</sub>	460	2.43 (2.21- 2.67)	6.01 (4.95- 7.30)	2.42 (0.22)	60	20
	F <sub>S3</sub>	360	2.35 (2.14- 2.58)	5.12 (4.33- 6.06)	2.82 (0.27)	56	17
	F <sub>S4</sub>	420	2.26 (2.07- 2.45)	4.93 (4.27- 5.69)	2.81 (0.25)	56	16
	F <sub>S5</sub>	320	2.84(2.63- 3.08)	5.49 (4.67-6.44)	3.34 (0.34)	71	18
Cepa susceptible		492	0.04 (0.03-0.05)	0.30 (0.21-0.45)	1.11 (0.10)	-	-

<sup>a</sup> n: tamaño de muestra

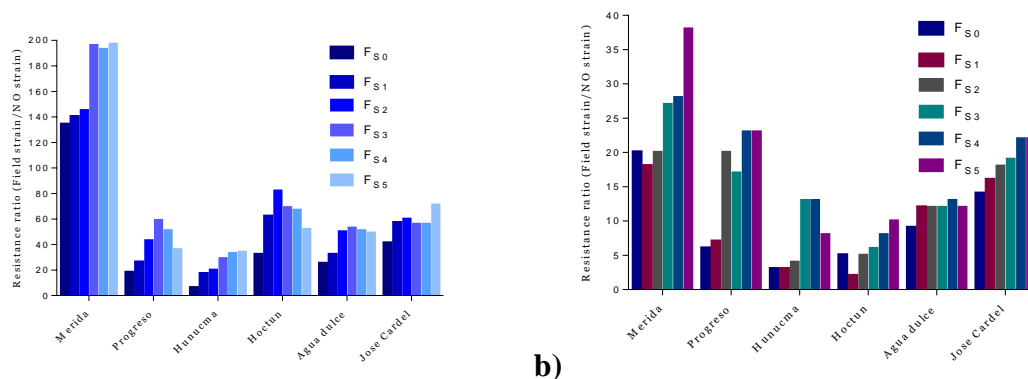
<sup>b</sup> b: pendiente de la regression lineal Probit-log,  $\pm$  error estándar

<sup>c</sup> LC: concentraciones letales 50% y 90% en microgramos por botella, intervalos de confianza al 95%

<sup>d</sup> FR: Factor de resistencia CL<sub>50</sub> población de campo/ cepa susceptible CL<sub>50</sub>

Las concentraciones letales también aumentaron entre F<sub>S0</sub> y F<sub>S5</sub>, con el RRCL<sub>50</sub> aumentando 5.6 veces en la cepa Hunucma (6 a 34 veces), dos veces en las cepas Agua Dulce y Progreso (25 a 49 veces y 18 a 36 veces, respectivamente) y se detectaron aumentos menores en las cepas de Mérida, Hoctún y José Cardel (134 a 197 veces, 32 a 52 veces y 41 a 71 veces, respectivamente) (Figura 3).

Al analizar los aumentos relativos en RRCK<sub>50</sub> y RRCL<sub>50</sub> durante la selección, la cepa Progreso mostró el mayor aumento de una sola generación ( $> 2.5$  veces) de F<sub>S1</sub> frente a F<sub>S2</sub> para CK<sub>50</sub>; sin embargo, Hunucma mostró el mayor aumento en RRCL<sub>50</sub> (2.83) en la primera generación seleccionada en relación con la generación parental (F<sub>S1</sub> vs F<sub>S0</sub>).



**Figura 3. a) Factor de Resistencia para CL<sub>50</sub> y b) CK<sub>50</sub> como respuesta a la selección con deltametrina.**

Al estimar la heredabilidad ( $h^2$ ) de la resistencia a deltametrina en las familias de selección, Mérida y Hochtun mostraron los valores más altos de ( $h^2$ ) 0.948 y 0.900, respectivamente, para CL<sub>50</sub>. En el caso de CK<sub>50</sub>, los valores más altos se obtuvieron para la cepa Progreso (0.779) y la cepa Mérida (0.519) (Tabla 7). La respuesta de la selección (R) también fue alta para las cepas de Mérida y Progreso para CK<sub>50</sub> y CL<sub>50</sub>.

La selección diferencial (S) fue alta en la cepa Progreso para CL<sub>50</sub>, pero en el caso de CK<sub>50</sub>, los valores más altos se obtuvieron para las cepas Hochtun y Hunucma. El número de generaciones requeridas para un aumento de 10 veces en CL<sub>50</sub>, (G), es el recíproco de la respuesta a la selección (R) (Tablas 8 y 9) (Tabashnik, 1992).

Por lo tanto, para las cepas Progreso, Mérida y Hochtun, fue necesaria una media de ~ 2 generaciones para un aumento de 10 veces en CL<sub>50</sub>; sin embargo, para Hochtun, Agua Dulce y José Cardel, fue necesaria una media de > 4 generaciones. Con respecto a CK<sub>50</sub>, fue necesaria una media de ~ 2 generaciones para un aumento de 10 veces para las cepas de Mérida y Progreso, pero para Hunucma, Hochtun, José Cardel y Agua Dulce, una media de 3, ~ 6, 7 y ~ 25 generaciones, respectivamente, fue necesario para un aumento de 10 veces (Tablas 8 y 9).

**Tabla 7. Heredabilidad ( $h^2$ ) obtenida para los parámetros  $CL_{50}$  y  $CK_{50}$  a través de cuatro generaciones de selección con deltametrina.**

Poblaciones seleccionada	$LC_{50}^a$			$KC_{50}^b$		
	$h^2$	$r^2$	$p^c$	$h^2$	$r^2$	$P$
Mérida	0.900	0.708	0.159	0.519	0.906	0.048*
Progreso	0.608	0.983	0.008**	0.779	0.945	0.028*
Hunucmá	0.227	0.936	0.033*	0.343	0.923	0.077
Hoctún	0.948	0.934	0.034*	0.177	0.907	0.048*
Agua dulce	0.392	0.998	0.010*	0.109	0.958	0.021*
Jose cardel	0.458	0.767	0.124	0.230	0.869	0.068

<sup>a</sup> Concentración letal

<sup>b</sup> Concentración *Knockdown*

<sup>c</sup> Valor de  $p$  R/S

**Tabla 8. Estimación de la heredabilidad ( $h^2$ ) de la resistencia in *Aedes aegypti* después de la selección con deltametrina para el parámetro concentración letal cincuenta ( $CL_{50}$ ).**

Población	Generación	$CL_{50}^a$	$b^b$	$\delta t^c$	$Pt^d$	$it^e$	$S^f$	$\Sigma S$	$R^g$	$\Sigma R$	$h^2$
Merida	FS0	5.350	1.066	0.938	-	-	-	-	-	-	
	FS1	5.600	1.827	0.547	22.130	1.346	0.737	0.737		0.000	
	FS2	5.800	1.824	0.548	23.990	1.295	0.710	1.447	0.200	0.200	
	FS3	7.870	1.930	0.518	20.710	1.400	0.725	2.172	2.070	2.270	
	FS4	7.730	1.926	0.519	24.120	1.295	0.672	2.844	0.140	2.410	
	FS5	7.880	1.824	0.548	-	-	-	-	0.150	2.560	0.900
Progreso	FS0	0.749	0.979	1.021	-	-	-	-	-	-	
	FS1	1.060	1.107	0.904	24.79	1.271	1.149	1.149		0.000	
	FS2	1.715	1.532	0.653	24.860	1.271	0.830	1.978	0.655	0.655	
	FS3	2.378	1.654	0.605	24.460	1.295	0.783	2.761	0.663	1.318	
	FS4	2.063	2.186	0.457	24.580	1.271	0.581	3.343	0.315	1.633	
	FS5	1.663	2.008	0.498	-	-	-	-	0.400	2.033	0.608
Hucnucma	FS0	0.245	1.244	0.804	-	-	-	-	-	-	
	FS1	0.694	1.393	0.718	24.680	1.271	0.912	0.912		0.000	
	FS2	0.805	1.458	0.686	24.670	1.271	0.872	1.784	0.111	0.111	
	FS3	1.164	1.940	0.516	24.240	1.295	0.668	2.452	0.359	0.470	
	FS4	1.331	2.453	0.408	24.480	1.295	0.528	2.980	0.167	0.637	
	FS5	1.370	1.922	0.520	-	-	-	-	0.039	0.676	0.227
Hoctun	FS0	1.302	1.928	0.519	-	-	-	-	-	-	
	FS1	2.501	2.239	0.447	24.79	1.271	0.568	0.568		0.000	
	FS2	3.270	2.676	0.374	23.830	1.271	0.475	1.042	0.769	0.769	
	FS3	2.764	2.521	0.397	24.410	1.295	0.514	1.556	0.506	1.275	

	FS4	2.677	2.472	0.405	24.890	1.271	0.514	2.070	0.087	1.362	
	FS5	2.076	2.950	0.339	-	-	-	-	0.601	1.963	0.948
Agua dulce	FS0	1.000	2.278	0.439	-	-	-	-	-	-	
	FS1	1.410	2.741	0.365	24.77	1.271	0.464	0.464		0.000	
	FS2	2.023	2.190	0.457	24.820	1.271	0.580	1.044	0.613	0.613	
	FS3	2.120	2.058	0.486	24.280	1.295	0.629	1.674	0.097	0.710	
	FS4	2.035	2.285	0.438	24.520	1.271	0.556	2.230	0.085	0.795	
	FS5	1.957	1.855	0.539	-	-	-	-	0.078	0.873	0.392
José Cardel	FS0	1.638	1.895	0.528	-	-	-	-	-	-	
	FS1	2.305	2.617	0.382	24.210	1.295	0.495	0.495		0.000	
	FS2	2.436	2.429	0.412	24.370	1.295	0.533	1.028	0.131	0.131	
	FS3	2.356	2.827	0.354	22.640	1.320	0.467	1.495	0.080	0.211	
	FS4	2.260	2.814	0.355	24.130	1.295	0.460	1.955	0.096	0.307	
	FS5	2.849	3.346	0.299	-	-	-	-	0.589	0.896	0.458

<sup>a</sup> Concentración letal cincuenta

<sup>b</sup> Valor de la pendiente de la regresión

<sup>c</sup> Desviación estándar fenotípica

<sup>d</sup> Porcentaje de sobrevivientes después de la selección

<sup>e</sup> Intensidad de la selección

<sup>f</sup> Selección diferencial

<sup>g</sup> Respuesta a la selección

**Tabla 9. Estimación de la heredabilidad ( $h^2$ ) de la resistencia in *Aedes aegypti* después de la selección con deltametrina para el parámetro concentracipon *knockdown* cincuenta (CK<sub>50</sub>).**

Población	Generación	CK <sub>50</sub> <sup>a</sup>	$b^b$	$\delta t^c$	Pt	It	S	$\Sigma S$	R	$\Sigma R$	$h^2$
Merida	FS0	1.855	2.959	0.338	-	-	-	-	-	-	
	FS1	1.628	2.094	0.478	21.920	1.346	0.643	0.643		0.000	
	FS2	1.852	1.699	0.589	24.010	1.295	0.762	1.405	0.224	0.224	
	FS3	2.421	1.196	0.836	20.670	1.372	1.147	2.552	0.569	0.793	
	FS4	2.556	1.364	0.733	24.030	1.295	0.949	3.502	0.135	0.928	
	FS5	3.446	1.505	0.664	-	-			0.890	1.818	0.519
Progreso	FS0	0.541	1.231	0.812	-	-	-	-	-	-	
	FS1	0.673	1.500	0.667	24.770	1.271	0.847	0.847		0.000	
	FS2	1.782	1.584	0.631	24.870	1.271	0.802	1.650	1.109	1.109	
	FS3	1.579	1.470	0.680	24.480	1.295	0.881	2.531	0.203	1.312	
	FS4	2.131	1.771	0.565	24.640	1.271	0.718	3.248	0.552	1.864	
	FS5	1.465	2.028	0.493	-	-	-	-	0.666	2.530	0.779
Hucnucma	FS0	0.343	1.169	0.856	-	-	-	-	-	-	

	FS1	0.253	1.376	0.727	24.730	1.271	0.924	0.924		0.000	
	FS2	0.334	0.964	1.037	24.670	1.271	1.318	2.242	0.081	0.081	
	FS3	1.145	1.005	0.995	24.400	1.295	1.289	3.531	0.811	0.892	
	FS4	1.160	4.308	0.232	24.480	1.295	0.301	3.831	0.015	0.907	
	FS5	0.751	1.987	0.503	-	-	-	-	0.409	1.316	0.343
Hoctun	FS0	0.484	1.633	0.612	-	-	-	-	-	-	
	FS1	0.231	1.358	0.736	24.780	1.271	0.936	0.936		0.000	
	FS2	0.484	0.889	1.125	24.620	1.271	1.430	2.366	0.253	0.253	
	FS3	0.573	1.348	0.742	24.460	1.295	0.961	3.326	0.089	0.342	
	FS4	0.754	1.764	0.567	24.860	1.271	0.721	4.047	0.181	0.523	
	FS5	0.949	1.479	0.676	-	-	-	-	0.195	0.718	0.177
Agua dulce	FS0	0.802	3.734	0.268	-	-	-	-	-	-	
	FS1	1.066	4.157	0.241	24.730	1.271	0.306	0.306		0.000	
	FS2	1.081	3.589	0.279	24.850	1.271	0.354	0.660	0.015	0.015	
	FS3	1.064	3.321	0.301	24.290	1.295	0.390	1.050	0.017	0.032	
	FS4	1.146	2.929	0.341	24.540	1.271	0.434	1.484	0.082	0.114	
	FS5	1.098	3.530	0.283	-	-	-	-	0.048	0.162	0.109
José Cardel	FS0	1.267	4.018	0.249	-	-	-	-	-	-	
	FS1	1.478	2.152	0.465	24.210	1.295	0.602	0.602		0.000	
	FS2	1.631	2.655	0.377	24.370	1.295	0.488	1.090	0.153	0.153	
	FS3	1.686	2.486	0.402	22.480	1.346	0.541	1.631	0.055	0.208	
	FS4	1.981	1.808	0.553	24.130	1.295	0.716	2.347	0.295	0.503	
	FS5	2.017	2.120	0.472	-	-	-	-	0.036	0.539	0.230

<sup>a</sup> Concentración *knockdown* cincuenta

<sup>b</sup> Valor de la pendiente de la regresión

<sup>c</sup> Desviación estándar fenotípica

<sup>d</sup> Porcentaje de sobrevivientes después de la selección

<sup>e</sup> Intensidad de la selección

<sup>f</sup> Selección diferencial

<sup>g</sup> Respuesta a la selección

## 7.2 Mutaciones Kdr

La tabla 10 resume las frecuencias de los alelos V410, I1016, C1534 en todas las poblaciones y generaciones (FS<sub>0</sub>-FS<sub>5</sub>). Las tres mutaciones kdr estaban presentes en todas las poblaciones parentales analizadas, con frecuencias que variaban entre 0.36-0.78 para el alelo L410 y 0.34-0.77 para I1016. Las frecuencias más altas fueron para C1534, que van desde 0.59-1. Todas las poblaciones estaban en equilibrio Hardy-Weinberg en la generación parental (FS<sub>0</sub>).



Las frecuencias del alelo L410 variaron entre 0.80-0.98 después de la selección con deltametrina, las frecuencias alélicas I1016 fueron 0,88-0,96 en  $F_{S5}$ .

Se encontraron un total de 20 combinaciones de tres genotipos (tri-locus) entre las poblaciones en la generación basal (Tabla 11). También se determinó la presencia de individuos heterocigotos para cada locus, individuos con el genotipo V410/L410 estuvieron presentes en todas las poblaciones, lo mismo para V1,016/I1,016, los heterocigotos del genotipo F1,534/C1,534 solo se encontraron en cuatro de las poblaciones analizadas (Progreso, Hochtún, Hunucmá y José Cardel) ya que el genotipo resistente C1,534/C1,534 se encontró en el 100% de los individuos analizados en dos de las poblaciones (Mérida y Agua dulce). Solo tres de las poblaciones analizadas presentaron individuos triple homocigoto susceptible V410/V410, V1,016/V1,016, F1,534/F1,534 (VV/VV/FF).

**Tabla 10. Frecuencias de las mutaciones V410L, V1016I y F1534C en hembras de *Aedes aegypti* después de la selección con deltametrina.**

Cepa	Generación		V410L							V1016I							F1534C					
		<i>n</i>	LL	VV	LV	Freq. (95% CI)	FIS	$\chi^2$ Hardy-Weinberg	<i>n</i>	II	VI	VV	Freq. (95% CI)	FIS	$\chi^2$ Hardy-Weinberg	<i>n</i>	CC	FC	FF	Freq. (95% CI)	FIS	$\chi^2$ Hardy-Weinberg
Mérida	FS0	32	21	8	3	0.78 (0.60-0.89)	0.26	2.3	32	20	9	3	0.77 (0.59-0.88)	0.21	1.49	32	32	0	0	1.00 ( 0.86-0.01)	-	-
	FS1	29	10	14	5	0.59 (0.40-0.74)	-	-	30	10	15	5	0.58 (0.40- 0.73)	-	-	32	32	0	0	1.00 ( 0.86-0.01)	-	-
	FS2	32	17	11	4	0.70 (0.52-0.83)	-	-	32	18	10	4	0.72 (0.54- 0.84)	-	-	32	32	0	0	1.00 ( 0.86-0.01)	-	-
	FS3	29	24	5	0	0.91 (0.74-0.98)	-	-	31	24	7	0	0.89 (0.72- 0.96)	-	-	31	31	0	0	1.00 ( 0.86-0.01)	-	-
	FS4	32	23	8	1	0.84 (0.67-0.93)	-	-	32	23	9	0	0.86 (0.69- 0.94)	-	-	32	32	0	0	1.00 ( 0.86-0.01)	-	-
	FS5	32	27	5	0	0.92 (0.73-0.98)	-	-	32	27	5	0	0.92 (0.76- 0.98)	-	-	32	32	0	0	1.00 ( 0.86-0.01)	-	-
Progreso	FS0	30	13	13	4	0.65 (0.47-0.79)	0.04	0.06	32	16	12	4	0.69 (0.51-0.82)	0.12	0.51	32	30	2	0	0.97 (0.82-1.00)	-0.03	0.03
	FS1	29	24	5	0	0.91 (0.74- 0.98)	-	-	32	10	22	0	0.66 (0.48-0.79)	-	-	32	32	0	0	1.00 ( 0.86-0.01)	-	-
	FS2	32	24	5	1	0.88 (0.71- 0.96)	-	-	30	24	5	1	0.88 (0.71- 0.96)	-	-	30	30	0	0	1.00 ( 0.86-0.01)	-	-
	FS3	30	29	2	1	0.94 (0.78- 0.99)	-	-	32	28	3	1	0.92 (0.76-0.98)	-	-	32	32	0	0	1.00 ( 0.86-0.01)	-	-
	FS4	32	17	12	1	0.77 (0.58-0.88)	-	-	32	19	12	1	0.78 (0.60- 0.89)	-	-	32	32	0	0	1.00 ( 0.86-0.01)	-	-
	FS5	32	27	5	0	0.92 (0.76-0.98)	-	-	31	26	5	0	0.92 (0.76- 0.98)	-	-	32	32	0	0	1.00 ( 0.86-0.01)	-	-
Hunucmá	FS0	32	5	13	14	0.36 (0.21-0.53)	0.11	0.44	32	4	14	14	0.34 (0.29-0.62)	0.03	0.02	32	14	13	5	0.64 (0.46-0.78)	0.11	0.44
	FS1	32	12	13	7	0.58 (0.21-0.53)	-	-	32	11	14	7	0.56 (0.39- 0.71)	-	-	32	24	6	2	0.84 (0.67- 0.93)	-	-
	FS2	21	6	9	6	0.50 (0.30- 0.69)	-	-	32	6	19	7	0.48 (0.32- 0.64)	-	-	32	23	4	5	0.78 (0.60- 0.89)	-	-
	FS3	30	14	14	2	0.70 (0.51- 0.83)	-	-	29	12	15	2	0.67 (0.48- 0.81)	-	-	29	20	7	2	0.81 (0.62- 0.91)	-	-
	FS4	32	28	3	1	0.92 (0.76- 0.98)	-	-	32	29	2	1	0.94 (0.78- 0.99)	-	-	32	32	0	0	1.00 ( 0.86-0.01)	-	-
	FS5	30	27	3	0	0.95 (0.79- 0.99)	-	-	31	28	3	0	0.95 (0.80-0.99)	-	-	32	32	0	0	1.00 ( 0.86-0.01)	-	-
Hoctún	FS0	32	5	21	6	0.48 (0.32-0.64)	-0.31	3.15	32	4	21	7	0.45 (0.20-0.51)	-0.32	3.36	32	10	18	4	0.59 ( 0.42-0.74)	0.16	0.88
	FS1	31	5	11	15	0.34 (0.19- 0.51)	-	-	32	5	11	16	0.33 (0.19- 0.50)	-	-	32	14	11	7	0.61 (0.43- 0.75)	-	-
	FS2	28	11	13	4	0.63 (0.44- 0.77)	-	-	27	9	14	4	0.59 (0.40- 0.75)	-	-	29	21	5	3	0.81 (0.62- 0.91)	-	-
	FS3	31	27	4	0	0.94 (0.78-0.99)	-	-	30	25	5	0	0.92 (0.75- 0.98)	-	-	30	30	0	0	1.00 ( 0.86-0.01)	-	-
	FS4	32	23	9	0	0.86 (0.69-0.94)	-	-	32	22	10	0	0.84 (0.67- 0.93)	-	-	32	32	0	0	1.00 ( 0.86-0.01)	-	-
	FS5	30	22	8	0	0.87 (0.69- 0.95)	-	-	32	24	8	0	0.88 (0.71- 0.95)	-	-	32	32	0	0	1.00 ( 0.86-0.01)	-	-
Agua dulce	FS0	30	9	15	6	0.55 (0.37-0.71)	-0.01	0.003	32	10	16	6	0.56 (0.39-0.71)	-0.01	0.01	32	32	0	0	1.00 ( 0.86-0.01)	-	-
	FS1	30	14	13	3	0.68 (0.50-0.82)	-	-	32	14	14	4	0.66 (0.48- 0.79)	-	-	32	32	0	0	1.00 ( 0.86-0.01)	-	-
	FS2	27	5	14	8	0.44 (0.27- 0.62)	-	-	31	5	18	8	0.45 (0.29- 0.62)	-	-	31	31	0	0	1.00 ( 0.86-0.01)	-	-
	FS3	34	6	22	6	0.50 (0.34- 0.65)	-	-	34	11	21	2	0.63 (0.46- 0.77)	-	-	34	34	0	0	1.00 ( 0.86-0.01)	-	-

	FS4	32	27	5	0	0.92 (0.76- 0.98)	-	-		32	28	4	0	0.94 (0.78- 0.99)	-	-		32	32	0	0	1.00 ( 0.86-0.01)	-	-
	FS5	32	31	1	0	0.98 (0.84- 1.01)	-	-		32	30	2	0	0.96 (0.82- 1.00)	-	-		32	32	0	0	1.00 ( 0.86-0.01)	-	-
Jose Cardel	FS0	32	14	14	4	0.66 (0.48-0.79)	0.03	0.02		31	13	13	5	0.63 (0.45- 0.77)	0.1	0.31		31	26	3	2	0.89 (0.72-0.96)	0.51	8.28
	FS1	32	18	11	3	0.73 (0.55- 0.85)	-	-		30	15	8	7	0.63 (0.45- 0.78)	-	-		32	32	0	0	1.00 ( 0.86-0.01)	-	-
	FS2	32	25	7	0	0.89 (0.72- 0.96)	-	-		32	24	8	0	0.88 (0.71- 0.95)	-	-		32	32	0	0	1.00 ( 0.86-0.01)	-	-
	FS3	30	23	7	0	0.88 (0.71- 0.96)	-	-		30	13	17	0	0.72 (0.53- 0.84)	-	-		30	30	0	0	1.00 ( 0.86-0.01)	-	-
	FS4	32	28	4	0	0.94 (0.78- 0.99)	-	-		32	29	3	0	0.95 (0.80- 0.99)	-	-		32	32	0	0	1.00 ( 0.86-0.01)	-	-
	FS5	30	19	10	1	0.80 (0.62- 0.90)	-	-		31	26	5	0	0.92 (0.76- 0.98)	-	-		32	32	0	0	1.00 ( 0.86-0.01)	-	-

n= tamaño de muestra

LL= L410 homozigoto

VI= V410/L410 heterozigoto

VV= silvestre

II= I1,016 homozigoto

VI= V1,016/I1,016 heterozigoto

VV= silvestre

CC= C1,534 homozigoto

FC= F1,534/C1,534 heterozigoto

FF= silvestre

**Tabla 11. Genotipos y frecuencia de individuos triple homocigoto resistente LL/II/CC a través de generaciones de selección (IC del 95%).**

Poblacion	n	Genotipos																				Triple homocigoto	
		LL/II/CC	LL/VI/CC	VL/II/CC	LL/VI/FC	LL/VV/FC	LL/VV/CC	VL/II/FC	VL/VI/CC	VV/II/CC	VV/VI/CC	VL/VI/FC	LL/VV/FF	VL/VI/FF	VV/VI/FC	VV/VV/CC	VL/VV/CC	VL/VV/FC	VV/VI/FF	VV/VV/FC	VV/VV/FF	RR	SS
Mérida	32	20	0	0	0	0	1	0	8	0	0	0	0	0	0	2	0	0	1	0	0	20	0
Progreso	32	7	4	7	1	1	1	0	6	2	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	7	0
Hunucmá	33	4	0	0	0	0	0	0	1	0	0	9	1	3	0	0	0	0	1	2	12	4	12
Hoctún	32	2	3	0	0	0	1	2	5	0	0	12	0	0	1	0	0	2	1	1	3	2	3
Agua dulce	30	9	0	0	0	0	0	0	15	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	9	0
José Cardel	32	13	1	1	0	0	1	0	8	0	1	3	0	0	0	1	1	0	0	0	2	13	2

n= tamaño de muestra

VV/VV/FF= silvestre VV410/ silvestre VV1,016/ silvestre FF1,534

VL/VI/FC= heterozigoto VL410/heterozigoto VI1,016/ heterozigoto FC1,534

LL/II/CC= Triple homocigoto mutante LL410/ II1,016/ CC1,534

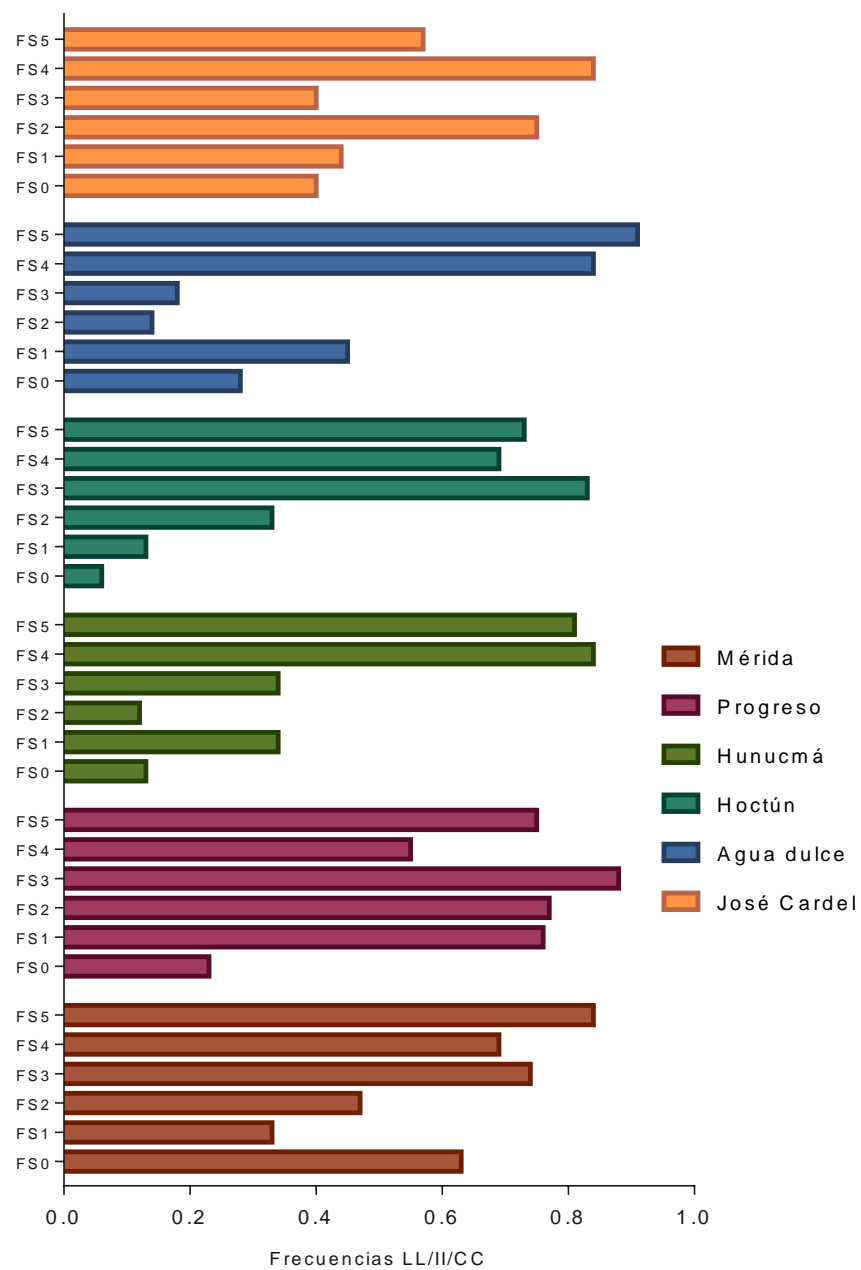
Los individuos triple homocigoto resistente para (tri-locus) L410/L410, I1,016/I1,016, C1,534/C1,534 (LL/II/CC) se encontraron en todas las poblaciones en la generación basal, e incremento su frecuencia a través de las generaciones de selección (Tabla 10). En general, las frecuencias de los tres alelos kdr aumentaron durante las generaciones seleccionadas. Las frecuencias de L410 desde la generación parental hasta la última generación seleccionada aumentaron de 0.78-0.92 en la cepa Mérida, 0.65-0.92 en Progreso, 0.36-0.95 en Hunucma, 0.48-0.87 en Hochtun, 0.55-0.98 en Agua Dulce y 0.66- 0,80 en José Cardel.

Para el alelo I1016, se observaron aumentos de 0.77-0.92 en la cepa Mérida, 0.69-0.92 en Progreso, 0.45-0.95 en Hunucma, 0.34-0.88 en Hochtun, 0.56-0.96 en Agua Dulce y 0.63-0.92 en José Cardel.

Las frecuencias del alelo C1534 aumentaron de 0.59-1 en la cepa Hochtun, 0.64-1 en Hunucma, 0.89-1 en José Cardel y 0.97-1 en Progreso; El alelo C1534 se fijó en 1.0 en las cepas de Mérida y Agua Dulce en todas las generaciones. Este alelo aumentó hasta la fijación de la primera selección con deltametrina ( $F_{S1}$ ) en las cepas de Progreso y José Cardel, en la tercera generación seleccionada para Hochtun y en la cuarta para Hunucma.

Los alelos L410 e I1016 se seleccionaron en casi la misma proporción de  $F_{S0}$  a  $F_{S5}$  en todas las poblaciones analizadas (Tabla 10, Figura 4).

La frecuencia de los alelos resistentes para cada mutación se correlacionó con el  $CK_{50}$  y el  $CL_{50}$  a través de las generaciones de selección.  $CK_{50}$  correlacionó con la frecuencia L410 en las cepas Mérida ( $r = 0.8294$ ,  $P = 0.04$ ) y Hochtun ( $r = 0.8169$ ,  $P = 0.047$ ); y con la frecuencia de I1016 en las cepas de Mérida ( $r = 0.8418$ ,  $P = 0.035$ ), Hochtun ( $r = 0.83$ ,  $P = 0.040$ ) y Jose Cardel ( $r = 0.8767$ ,  $P = 0.021$ ). En el caso de  $CL_{50}$ , las frecuencias de L410, I1016 y C1534 se correlacionaron fuertemente con  $CL_{50}$  en la cepa Hunucma ( $r = 0.948$ ,  $P = 0.0040$ ;  $r = 0.9226$ ,  $P = 0.0088$ ;  $r = 0.8990$ ,  $P = 0.0148$ ). La presencia y frecuencia de los individuos triple homocigoto resistente muestran una relación significativa ( $r^2 = 0.7354$ ,  $p = 0.0290$ ) con el parámetro  $CK_{50}$  en la última generación de selección ( $F_{S5}$ ).



**Figura 4. Frecuencias de triple homocigoto resistente LL<sub>410</sub>/ II<sub>1,016</sub>/CC<sub>1,534</sub> a través de la selección.**

### 7.3 Pruebas bioquímicas

En la tabla 12 se muestran los valores medios de actividad media enzimática obtenidos en los ensayos bioquímicos en la generación basal, se analizaron al menos 30 individuos por población.

Al comparar los percentiles 99 respecto a la cepa de referencia New Orleans, cinco de las seis poblaciones analizadas (Mérida, Progreso, Hunucma, José Cardel y Agua dulce) mostraron actividad enzimática alterada para alfa-esterasas (>50% de los individuos sobrepasa el umbral de resistencia), Hochtun presentó actividad incipientemente alterada correspondiente al 39% de acuerdo a Montella (2007).

Las oxidasas de función múltiple solamente se observaron sobreexpresadas en Progreso, Hochtun, Agua dulce y José Cardel y se encontraron entre el 69-95% de los especímenes analizados.

Solamente la población de Agua dulce mostró actividad enzimática alterada (=71%) de glutathione-S-transferasas en la generación basal y se observó un aumento en los niveles medios de actividad en las cepas Hochtun y Agua Dulce ( $p < 0.0001$ ) (Tabla 7), y de hecho esta fue la única enzima que se correlacionó significativamente con los valores  $CL_{50}$  de deltametrina en el FS4 ( $r = 0.83$ ,  $P < 0.05$ ).

Al examinar la asociación entre los valores de  $LC_{50}$  de deltametrina y la actividad enzimática para los padres no hubo valores de correlación significativos, por lo tanto, no podemos asociar un mecanismo enzimático con la resistencia a la deltametrina.

Tabla 12. Cuantificación de la actividad enzimática en poblaciones de *Aedes aegypti* en la generación basal y en cada generación de selección con respecto a la cepa de referencia de New Orleans.

Población		$\alpha$ -EST $\pm$ DE			B-EST $\pm$ DE		MFO $\pm$ DE		GST $\pm$ DE		AChE $\pm$ DE	
		(nmol/mg ptn/min)			(nmol/mg ptn/min)		( $\mu$ g Cyt/mg de ptn)		(nmol/mg ptn/min)		remanent activity %	
		n <sup>a</sup>	Media	p99 <sup>d</sup>	Media	p99	Media	p99	Media	p99	Media	p99
	New Orleans <sup>b</sup>	30	3.53 $\pm$ 0.50	4.77	8.56 $\pm$ 0.97	10.9	72.59 $\pm$ 9.63	94.31	0.05 $\pm$ 0.01	0.09	102.2 $\pm$ 11.10	126.19
		N	Media	%>p99 <sup>e</sup>	Media	%>p99	Media	%>p99	Media	%>p99	Media	%>p99
F <sub>0</sub>	Merida	30	7.18 $\pm$ 1.21	99	13.11 $\pm$ 2.26	79	87.30 $\pm$ 16.44	31	0.03 $\pm$ 0.01	0	88.58 $\pm$ 16.52	0
	Progreso	30	5.31 $\pm$ 0.64	82	10.00 $\pm$ 1.03	16	113.2 $\pm$ 22.45	69	0.08 $\pm$ 0.03	48	101.60 $\pm$ 7.47	0
	Hunucma	30	6.23 $\pm$ 0.73	99	10.95 $\pm$ 0.80	43	85.08 $\pm$ 12.84	23	0.05 $\pm$ 0.01	1	101.60 $\pm$ 8.27	0
	Hoctún	30	4.80 $\pm$ 0.69	39	10.76 $\pm$ 1.10	40	106.20 $\pm$ 11.04	81	0.07 $\pm$ 0.01	8	104.70 $\pm$ 8.32	2
	Agua dulce	30	6.58 $\pm$ 0.85	100	11.11 $\pm$ 0.86	54	132.10 $\pm$ 30.02	97	0.11 $\pm$ 0.03	71	86.78 $\pm$ 9.28	0
	Cardel	30	7.77 $\pm$ 0.88	100	12.75 $\pm$ 1.56	95	128.10 $\pm$ 16.51	95	0.06 $\pm$ 0.01	3	108.70 $\pm$ 16.32	4
F <sub>1</sub>		N	Media	%>p99	Media	%>p99	Media	%>p99	Media	%>p99	Media	%>p99
	Merida	30	5.73 $\pm$ 0.69	88	10.33 $\pm$ 0.78	24	94.27 $\pm$ 10.83	50	0.47 $\pm$ 0.12	0	94.76 $\pm$ 6.91	0
	Progreso	30	7.86 $\pm$ 0.64	100	9.81 $\pm$ 1.12	11	98.54 $\pm$ 13.80	56	0.63 $\pm$ 0.27	18	104.36 $\pm$ 5.49	0
	Hunucma	30	7.80 $\pm$ 0.84	100	10.02 $\pm$ 1.28	18	112.57 $\pm$ 26.94	70	0.89 $\pm$ 0.28	68	96.54 $\pm$ 5.01	0
	Hoctún	30	4.04 $\pm$ 0.84	11	9.43 $\pm$ 1.71	15	89.01 $\pm$ 18.30	38	0.34 $\pm$ 0.37	1	105.66 $\pm$ 19.34	6
	Agua dulce	30	6.69 $\pm$ 0.78	100	11.35 $\pm$ 1.69	57	107.46 $\pm$ 13.62	87	0.11 $\pm$ 0.64	6	95.30 $\pm$ 9.65	0
	Cardel	30	3.80 $\pm$ 0.88	10	8.11 $\pm$ 1.07	0	96.22 $\pm$ 15.30	50	0.87 $\pm$ 0.30	50	110.21 $\pm$ 12.25	3
F <sub>2</sub>		N	Media	%>p99	Media	%>p99	Media	%>p99	Media	%>p99	Media	%>p99
	Merida	30	6.75 $\pm$ 0.60	99	11.23 $\pm$ 1.26	74	91.57 $\pm$ 11.82	33	0.70 $\pm$ 0.15	25	103.09 $\pm$ 10.92	0
	Progreso	30	6.52 $\pm$ 0.87	99	12.44 $\pm$ 1.30	89	87.45 $\pm$ 14.30	32	0.54 $\pm$ 0.18	3	106.35 $\pm$ 22.60	2
	Hunucma	30	6.03 $\pm$ 0.82	96	10.51 $\pm$ 0.66	79	82.38 $\pm$ 7.83	7	0.37 $\pm$ 0.11	0	97.18 $\pm$ 8.55	0
	Hoctún	30	6.27 $\pm$ 0.47	99	10.84 $\pm$ 0.98	44	86.52 $\pm$ 12.45	31	0.87 $\pm$ 0.27	58	98.33 $\pm$ 6.08	0
	Agua dulce	30	6.69 $\pm$ 0.79	99	9.45 $\pm$ 1.16	5	81.67 $\pm$ 11.91	6	0.73 $\pm$ 0.29	31	98.14 $\pm$ 6.43	0
	Cardel	30	6.60 $\pm$ 0.65	99	12.87 $\pm$ 1.15	94	95.78 $\pm$ 14.69	39	0.32 $\pm$ 0.11	0	99.20 $\pm$ 5.78	0
F <sub>3</sub>		N	Media	%>p99	Media	%>p99	Media	%>p99	Media	%>p99	Media	%>p99
	Merida	30	4.43 $\pm$ 5.22	64	9.93 $\pm$ 1.16	20	79.41 $\pm$ 12.43	10	0.56 $\pm$ 0.21	17	102.74 $\pm$ 4.91	0
	Progreso	30	6.97 $\pm$ 0.45	99	11.70 $\pm$ 0.93	81	84.93 $\pm$ 7.03	9	1.13 $\pm$ 0.26	90	96.79 $\pm$ 6.68	0
	Hunucma	30	8.80 $\pm$ 0.56	99	13.85 $\pm$ 1.05	99	76.67 $\pm$ 7.06	0	0.54 $\pm$ 0.12	3	110.76 $\pm$ 15.91	7
	Hoctún	30	6.21 $\pm$ 0.39	99	10.50 $\pm$ 0.69	33	73.27 $\pm$ 4.90	0	0.42 $\pm$ 0.11	0	105.30 $\pm$ 11.41	1
	Agua dulce	30	6.51 $\pm$ 0.85	99	10.89 $\pm$ 1.67	44	83.45 $\pm$ 10.15	5	0.13 $\pm$ 0.03	0	103.77 $\pm$ 9.58	2
	Cardel	30	7.21 $\pm$ 0.60	99	11.17 $\pm$ 0.90	49	77.59 $\pm$ 6.37	0	0.50 $\pm$ 0.14	1	108.32 $\pm$ 9.09	1



		N	Media	%>p99	Media	%>p99	Media	%>p99	Media	%>p99	Media	%>p99
F <sub>4</sub>	<b>Merida</b>	30	4.59 ±0.67	29	10.19 ±1.78	20	87.68 ±8.14	22	0.90 ±0.21	75	96.43 ±7.69	0
	<b>Progreso</b>	30	3.20 ±0.38	0	6.72 ±0.60	0	95.73 ±6.40	57	0.61 ±0.52	34	96.54 ±7.26	0
	<b>Hunucma</b>	30	5.57 ±0.69	90	8.51 ±0.88	0	84.16 ±10.74	19	0.64 ±0.25	22	98.96 ±4.09	7
	<b>Hoctún</b>	30	5.34 ±0.61	82	10.17 ±0.90	25	82.48 ±8.22	19	0.49 ±0.16	1	96.62 ±6.10	1
	<b>Agua dulce</b>	30	5.55 ±0.57	94	9.52 ±0.86	2	75.84 ±8.56	0	0.50 ±0.18	3	99.27 ±6.04	2
	<b>Cardel</b>	30	9.45 ±0.83	99	14.67 ±1.32	97	70.20 ±9.79	0	0.65 ±0.23	10	105.02 ±3.88	1
		N	Media	%>p99	Media	%>p99	Media	%>p99	Media	%>p99	Media	%>p99
F <sub>5</sub>	<b>Merida</b>	30	4.29 ±0.55	14	7.53 ±0.97	0	61.85 ±8.80	0	0.59 ±0.18	17	99.37 ±6.47	0
	<b>Progreso</b>	30	5.84 ±0.68	92	12.22 ±1.17	91	72.17 ±7.59	0	0.78 ±0.30	47	101.59 ±11.87	1
	<b>Hunucma</b>	30	7.05 ±0.55	99	10.76 ±0.58	34	70.72 ±7.03	0	0.45 ±0.11	0	101.41 ±10.27	0
	<b>Hoctún</b>	30	3.68 ±0.50	1	8.19 ±1.19	0	71.93 ±6.28	0	0.86 ±0.20	54	96.05 ±7.62	0
	<b>Agua dulce</b>	30	6.69 ±0.81	99	11.28 ±1.40	55	67.35 ±6.25	0	1.03 ±0.35	80	109.36 ±15.07	12
	<b>Cardel</b>	30	4.78 ±0.81	49	10.27 ±1.22	29	77.07 ±6.16	0	0.49 ±0.17	2	100.23 ±21.85	1
		N	Media	%>p99	Media	%>p99	Media	%>p99	Media	%>p99	Media	%>p99

<sup>a</sup> Tamaño de muestra

<sup>b</sup> Cepa de referencia

<sup>c</sup> Valor medio de actividad para cada enzima ± desviación estándar

<sup>d</sup> percentil 99<sup>th</sup> para cepa de referencia

<sup>e</sup> %>p99 Porcentaje de individuos por encima del percentil 99<sup>th</sup> de la cepa de referencia, valores alterados están subrayados (> 50%)

## 7.4 RNA-seq

### 7.4.1 Genes diferencialmente expresados

La tabla 13 resume las comparaciones biológicas y el total de genes diferencialmente expresados (DE) para las poblaciones Jose Cardel (JC), Mérida (MER) y Hunucma (HUN) en la generación basal respecto a la cepa de referencia New Orleans y después de la selección con deltametrina. Se obtuvieron entre 8, 517- 10, 830 genes entre las poblaciones por cada comparación biológica, José Cardel presento el mayor número de genes DE ( $|FC| > 2.0$  &  $adjP < 0.05$ ) en ambas comparaciones, respecto a la generación basal (180) Vs la cepa de referencia NOr y respecto a la selección con deltametrina FS0 Vs FS4 (72) (Cuadro 1).

**Tabla 13. Genes diferencialmente expresados por población por comparación biológica.**

Comparaciones biológicas	Total genes encontrados	Total genes DE Adj P < 0.05	( $ FC  > 2.0$ & $adjP < 0.05$ ) up	( $ FC  > 2.0$ & $adjP < 0.05$ ) down
JC <sub>FS0</sub> Vs Nor	10, 830	180	143	37
MER <sub>FS0</sub> Vs NOr	10, 278	22	19	3
HUN <sub>FS0</sub> Vs NOr	10, 655	45	25	20
JC <sub>FS4</sub> Vs JC <sub>FS0</sub>	10, 748	72	71	1
MER <sub>FS4</sub> Vs MER <sub>FS0</sub>	8, 517	16	16	0
HUN <sub>FS4</sub> Vs HUN <sub>FS0</sub>	10, 087	61	60	1

JC= Jose Cardel, MER= Mérida, HUN= Hunucma

FS<sub>0</sub>, generación basal, sin selección con deltametrina

FS<sub>4</sub>, cuatro generaciones de selección con deltametrina

DE= Diferencialmente expresados

### 7.4.2 Genes diferencialmente expresados relacionados a la selección con deltametrina.

Del total de genes diferencialmente expresados (396), 36 se encontraron relacionados entre las poblaciones de campo FS0 respecto a Nueva Orleans (generación basal sin exposición a insecticidas) (Figura 5a), 32 para HUN<sub>FS0</sub> (21 sobreexpresados y 11 subexpresados), 35 para JC<sub>FS0</sub> (25 sobreexpresados y 10 subexpresados), 33 para MER<sub>FS0</sub> (22 sobreexpresados y 11 subexpresados). Los genes (AAEL021091 y AAEL025779) estuvieron presentes en las tres poblaciones AAEL021091 es una glicoproteína y su función es poco conocida y AAEL025779 (SUMO-conjugating

enzyme UBC9-B) esta anotado en humanos para diversas funciones, entre ellas, ciclo celular y división celular, regulación de la trascricpción del DNA y RNA, entre otras, por lo que la presencia de estos genes entre las poblaciones, puede ser más de carácter esencial.

Al hacer las comparaciones entre las poblaciones, seleccionadas con deltametrina (FS4) con respecto a la generación basal, se encontraron 30 genes relacionados entre las poblaciones (Figura 5).

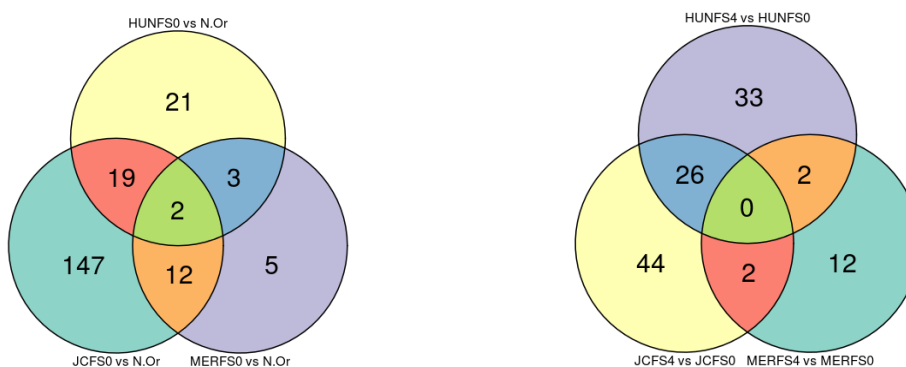


Figura 5. a) genes DE entre las poblaciones F<sub>S0</sub> Vs N. Or; b) Genes DE entre las poblaciones F<sub>S4</sub> Vs F<sub>S0</sub>.

La tabla 14, lista los genes DE y compartidos entre las poblaciones de campo analizadas, los genes obtenidos fueron agrupados en 11 categorías, nueve de los genes DE son de función desconocida, y nueve relacionados a estrés oxidativo redox y estrés mitocondrial AAEL018658 (NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 2), AAEL018662 (Cytochrome c oxidase), AAEL018668 (ATP synthase F0 subunit 6), AAEL018680 (NADH dehydrogenase subunit 4), AAEL018669 (Cytochrome c oxidase subunit III), AAEL018681 NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 4L, AAEL018684 (NADH dehydrogenase subunit 6), AAEL018685 (Cytochrome b) y AAEL018687 (NADH dehydrogenase subunit 1). Así como las mucinas AAEL007483 (Mucin-5AC) y AAEL013367 (Mucin-2) relacionadas la digestión, y AAEL013766 (Obstructor-E) relacionado a la síntesis de quitina.

Los genes DE para las familias seleccionadas con deltametrina se agruparon en 9 categorías (Tabla 15), el mayor número de genes DE corresponden a genes con diversas funciones en la síntesis y metabolismo de cutícula, AAEL003259 (Endocuticle structural glycoprotein ABD-4), AAEL004897 (Like chitinase 10), AAEL017402 (Adult cuticle protein 1), AAEL013766 (Obstructor-E), AAEL004292 (Circumsporozoite protein), AAEL013515 (Pupal cuticle protein putative), AAEL014419 (Cuticle protein CP14.6), AAEL026304 (Adult cuticle protein 1-like LOC5573911) y AAEL003049 (Pupal cuticle protein 78E).

**Tabla 14. Genes diferencialmente expresados compartidos entre las poblaciones F<sub>S0</sub> de acuerdo a las comparaciones biológicas F<sub>S0</sub> Vs New Orleans (FC|>2.0 & adjP<0.05).**

No	Gene ID	Transcript	Function	Group
1	AAEL001951	Actin Act-4	Cytoskeleton	CS
2	AAEL002718	Chitin Synthase	Chitin metabolism	MET
3	AAEL008861	Uncharacterized LOC5571163	Zinc ion binding	RTT
4	AAEL009108	Protease m1 zinc metalloprotease	metallopeptidase activity	PRO
5	AAEL012693	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM37	Ligasa	PRO
6	AAEL018658	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 2	Respiratory chain	RSM
7	AAEL018662	Cytochrome c oxidase subunit I	Respiratory chain	RSM
8	AAEL018668	ATP synthase F0 subunit 6	Mitochondrial	RSM
9	AAEL018669	Cytochrome c oxidase subunit III	Aerobic electron transport chain	RSM
10	AAEL018680	NADH dehydrogenase subunit 4	Mitochondrial electron transport,	RSM
11	AAEL018681	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 4L	Respiratory-chain enzyme	RSM
12	AAEL018684	NADH dehydrogenase subunit 6	Catalytic activity	RSM
13	AAEL018685	Cytochrome b	Mitochondrial electron transport,	RSM
14	AAEL018687	NADH dehydrogenase subunit 1	Oxidation-reduction process	RSM
15	AAEL019789	40S ribosomal protein S3a	Cell differentiation, traslation, viral transcription	RTT
16	AAEL002564	Uncharacterized LOC5580189	Unknown	UNK
17	AAEL007281	Stretchin-mlck	Muscle	CS
18	AAEL025761	Uncharacterized protein	Unknown	UNK
19	AAEL018241	Uncharacterized protein	Unknown	UNK
20	AAEL027327	Uncharacterized LOC110676057	Unknown	UNK
21	AAEL025779	SUMO-conjugating enzyme UBC9-B	Diverse functions	DF
22	AAEL013766	Obstructor-E	Cuticula	CUT
23	AAEL004212	Leucine-rich repeat-containing protein 20	Diverse functions	DF
24	AAEL001437	Uncharacterized LOC5570536	Unknown	UNK
25	AAEL003216	Endocuticle structural glycoprotein SgAbd-2	Structural constituent of cuticle	CUT
26	AAEL007483	Mucin-5AC	Chitin metabolic process	DI

27	AAEL013367	Mucin-2	Unknown	DI
28	AAEL007641	Coiled-coil domain-containing protein lobo (LOC5569456)	Catalyze protein cross-linking during eggshell formation	RE
29	AAEL004555	Uncharacterized LOC5565038	Unknown	IMM
30	AAEL011839	Uncharacterized LOC5575459	Unknown	UNK
31	AAEL017987	Pollen-specific leucine-rich repeat extensin-like protein 3	Unknown	UNK
32	AAEL018661	tRNA-Tyr	Replication	RTT
33	AAEL018689	16S ribosomal RNA	Traduction	RTT
34	AAEL021091	Uncharacterized histidine-rich protein DDB_G0274557-like	Glycoprotein	UNK
35	AAEL025347	LncRNA	Epigenetic regulation	RTT
36	AAEL027353	Uncharacterized protein	Unknown	UNK

Abreviaciones de los grupos funcionales: DS, desintoxicación y respuesta al estrés, CS, citoesqueleto y estructural, DF, diversas funciones, IMM, inmunidad, MET, metabolismo, RSM, redox y estrés mitocondrial, RTT, replicación, transcripción y traducción, TRP, transporte, UNK, no caracterizadas, funciones desconocidas, CUT, cutícula, PRO, proteolisis, proteosomal. DI, digestión, RE, reproducción.

**Tabla 15. Genes diferencialmente expresados compartidos entre las poblaciones F<sub>S4</sub> de acuerdo a las comparaciones biológicas F<sub>S4</sub> Vs F<sub>S0</sub> (FC|>2.0 & adjP<0.05).**

No	Gene ID	Transcrip	Function	Group
1	AAEL003259	Endocuticle structural glycoprotein ABD-4	Structural constituent of cuticle	CUT
2	AAEL022665	Histidine-rich protein PFHRP-II-like	Antigen	IMM
3	AAEL013367	Mucin-2	Unknown	DI
4	AAEL004897	Brain chitinase	Chitin metabolic process	CUT
5	AAEL017402	Adult cuticle protein 1	Cuticle prontein	CUT
6	AAEL003430	Regulator of microtubule dynamics protein 1	Unknown	CS
7	AAEL007281	Stretchin-mlck	Muscle	CS
8	AAEL013766	Obstructor-E	Protein cuticular, larval cuticle	CUT
9	AAEL017987	Pollen-specific leucine-rich repeat extensin-like protein 3	Unknown	UNK
10	AAEL006888	Proteoglycan 4	Insect midgut	DI
11	AAEL004292	Circumsporozoite protein	Structural constituent of cuticle-AAEL004292-PA	CUT

12	AAEL013515	Pupal cuticle protein, putative	Pupal cuticle protein, putative	CUT
13	AAEL027311	Histidine-rich protein PFHRP-II-like	Antigen	IMM
14	AAEL001437	Uncharacterized LOC5570536	Unknown	UNK
15	AAEL004212	Leucine-rich repeat-containing protein 20	Diverse functions	DF
16	AAEL001951	Actin Act-4	Cytoskeleton	CS
17	AAEL003419	Uncharacterized LOC5578124	Unknown	UNK
18	AAEL026304	Adult cuticle protein 1-like LOC5573911	Unknown	CUT
19	AAEL017563	Bifunctional endo-1,4-beta-xylanase XylA	Endo-1,4-beta-xylanase activity	DI
20	AAEL014419	Cuticle protein CP14.6	Structural constituent of cuticle	CUT
21	AAEL002759	Tropomyosin-1	Muscular contraction	CS
22	AAEL025784	Mucin-5AC	Cytoskeletal and estructural	DI
23	AAEL027975	Paternally-expressed gene 3 protein	Unknown	RE
24	AAEL008066	trkB protein, putative	Positive regulation of locomotion	CS
25	AAEL026432	Uncharacterized LOC5575879	Unknown	UNK
26	AAEL003049	Pupal cuticle protein 78E	Development	CUT
27	AAEL020593	Uncharacterized LOC110677064	Unknown	UNK
28	AAEL018678	NADH dehydrogenase subunit 5	Respiratory chain mitochondrial	RSM
29	AAEL003012	Matrix Metalloprotease (MMP)	Zinc metalloprotease	PRO
30	AAEL019797	Venom allergen 5	May function as an endopeptidase	TR

Abreviaciones de los grupos funcionales: DS, desintoxicación y respuesta al estrés, CS, citoesqueleto y estructural, DF, diversas funciones, IMM, inmunidad, MET, metabolismo, RSM, redox y estrés mitocondrial, RTT, replicación, transcripción y traducción, TRP, transporte, UNK, no caracterizadas, funciones desconocidas, CUT, cutícula, PRO, proteólisis, proteosoma. DI, digestión, RE, reproducción.

### 7.4.3 Función biológica de los genes diferencialmente expresados

El total de genes relacionados entre las poblaciones fueron agrupados en 12 categorías, el 21.2% de dichos genes no cuentan con una anotación ontológica o su función es desconocida. Los genes relacionados a las síntesis de quitina y proteínas cuticulares representaron el 16.7% (Figura 2).

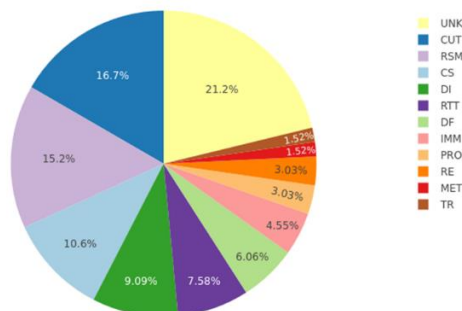


Figura 6. Total, de genes encontrados en la generación basal FS0 y en la FS4 agrupados por categorías.

Los genes relacionados a las poblaciones en la generación basal (FS0 Vs N. Or), estuvieron representados por 11 categorías: CS (2) estructurales, CUT (2) relacionados a la cutícula, DF (2) diversas funciones, DI (2) digestión, IMM (2) inmunidad, MET (1) metabolismo, PRO (2) proteólisis, RE (2) reproducción, RSM (9) redox y estrés mitocondrial, RTT (5) replicación, transcripción y traducción y UKN (9) función desconocida. Mientras que los genes relacionados a la selección con deltametrina (FS4 Vs FS0) estuvieron representados por 9 categorías: CS (5), CUT (9), DF (2), DI (4), IMM (2), RE (1), RSM (1), TR (1) y UKN (5).



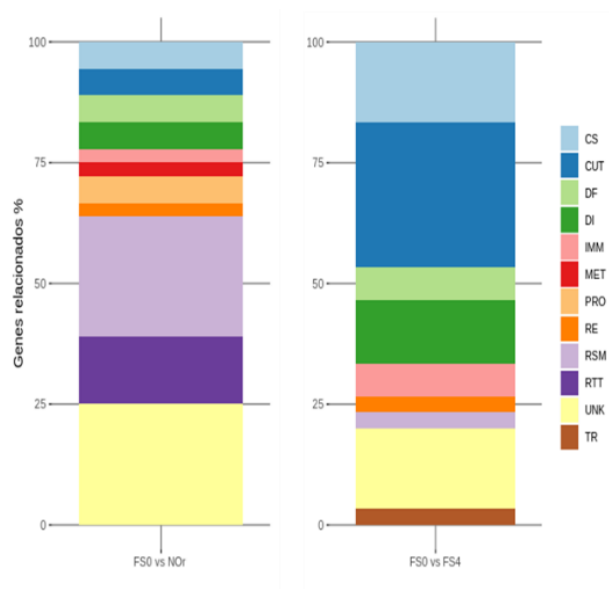


Figura 7. Categorías biológicas de los genes encontrados en los contrastes  $F_{S0}$  Vs NOR y  $F_{S4}$  Vs  $F_{S0}$ .

Los genes relacionados a las poblaciones en la generación basal ( $F_{S0}$  Vs N. Or), estuvieron representados por 11 categorías: CS (2) estructurales, CUT (2) relacionados a la cutícula, DF (2) diversas funciones, DI (2) digestión, IMM (2) inmunidad, MET (1) metabolismo, PRO (2) proteolisis, RE (2) reproducción, RSM (9) redox y estrés mitocondrial, RTT (5) replicación, transcripción y traducción y UNK (9) función desconocida. Mientras que los genes relacionados a la selección con deltametrina ( $F_{S4}$  Vs  $F_{S0}$ ) estuvieron representados por 9 categorías: CS (5), CUT (9), DF (2), DI (4), IMM (2), RE (1), RSM (1), TR (1) y UNK (5).

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1 Pruebas de susceptibilidad

Estudios sobre susceptibilidad y monitoreo de resistencia en México, sugieren resistencia en las poblaciones de estudio. En este estudio, se encontró que cinco de las poblaciones analizadas eran altamente resistentes a la deltametrina en la generación basal según la  $CL_{50}$  ( $RRCL_{50} > 10X$ ), y solo una población mostró resistencia moderada ( $RRCL_{50}$  5-10X). Rodríguez et al. (2010) reporta nula o baja mortalidad en mosquitos *Ae. aegypti* a diferentes insecticidas piretroides evaluados en el estado de Guerrero. La resistencia cruzada a piretroides también ha sido reportada en poblaciones del estado de Veracruz (Flores et al. 2013), seis de estas poblaciones con antecedentes de resistencia a piretroides fueron expuestos a diferentes concentraciones de clorpirifos para determinar su estado de susceptibilidad, los resultados señalan resistencia a dicho organofosforado en al menos tres de las poblaciones evaluadas (López et al. 2014).

Che-Mendoza et al. (2014) evaluó el estado de susceptibilidad de poblaciones de *Ae. aegypti* procedentes del estado de Yucatán y de Guerrero, los resultados señalan resistencia a permetrina en al menos el 90% de las poblaciones evaluadas para el estado de Yucatán y completa resistencia en todas las poblaciones de Guerrero.

Los planes de monitoreo y manejo de la resistencia a los insecticidas son cada vez más importantes a medida que el uso de insecticidas continúa creciendo en respuesta a la creciente amenaza de enfermedades transmitidas por vectores. El control de los mosquitos adultos en México se ha llevado a cabo principalmente con piretroides desde 1999, y la deltametrina ha estado en uso desde principios de 2000 (DOF, 2003).

Al estimar la heredabilidad ( $h^2$ ) de la resistencia a deltametrina en las familias de selección, Mérida y Hochtún mostraron los valores más altos de ( $h^2$ ) 0.948 y 0.900, respectivamente, para  $CL_{50}$ . En el caso de  $CK_{50}$ , los valores más altos se obtuvieron para la cepa Progreso (0.779) y la cepa Mérida (0.519) (Tabla 7). La respuesta de la selección (R) también fue alta para las cepas de Mérida y Progreso para  $CK_{50}$  y  $CL_{50}$ . Nuestros resultados con valores de heredabilidad ( $h^2 > 0.90$ ) sugieren una variación genética aditiva. Un valor alto de  $h^2$  predice una respuesta rápida a la selección, mientras que un valor bajo sugiere una respuesta lenta a la selección artificial (Saavedra et al. 2012).

La selección diferencial (S) fue alta en la cepa Progreso para CL<sub>50</sub>, pero en el caso de CK<sub>50</sub>, los valores más altos se obtuvieron para las cepas Hochtun y Hunucma. El número de generaciones requeridas para un aumento de 10 veces en CL<sub>50</sub>, (G), es el recíproco de la respuesta a la selección (R) (Tablas 8y 9) (Tabashnik, 1992).

## **8.2 Mutaciones Kdr**

Las frecuencias del alelo L410 variaron entre 0.80-0.98 después de la selección con deltametrina, este alelo puede disminuir significativamente la sensibilidad del canal de sodio tanto para la permetrina como para la deltametrina (Haddi et al. 2017).

Las frecuencias alélicas I1016 fueron 0,88-0,96 en F<sub>S5</sub>; Este alelo se ha relacionado con la resistencia a los piretroides tipo I y tipo II (Plernsub et al.2016). El alelo C1534 se ha asociado más con la resistencia a los piretroides tipo I, como la permetrina, pero alcanzó la fijación por F<sub>S5</sub> en todas las cepas analizadas. Estos resultados sugieren que la deltametrina puede seleccionar C1534 más rápidamente que I1016, corroborando los hallazgos de Álvarez et al. (2015) Se ha informado que I1016 y C1534 coexisten en poblaciones brasileñas (Linss et al. 2014), y recientemente se asociaron con resistencia a la deltametrina (Valle et al. 2019). La co-ocurrencia de I1016 y C1534 también ha sido reportada en poblaciones mexicanas por diferentes grupos (Vera-Maloof et al. 2015, Deming et al.2016, López-Monroy et al.2018). Vera-Maloof y col. (2015) sugirieron originalmente que C1534 evolucionó independientemente de I1016, pero recientemente Saavedra et al. (2018) reportaron evidencia que sugiere que C1534, I1016 y L410 evolucionaron en paralelo.

## **8.3 Pruebas bioquímicas**

Al comparar los percentiles 99 respecto a la cepa de referencia New Orleans, cinco de las seis poblaciones analizadas (Mérida, Progreso, Hunucma, José Cardel y Agua dulce) mostraron actividad enzimática alterada para alfa-esterasas (>50% de los individuos sobrepasa el umbral de resistencia), Hochtun presento actividad incipientemente alterada correspondiente al 39% de acuerdo a Montella (2007) actividad enzimática alterada de estas enzimas ya ha sido reportada en estudios previos en México induciendo resistencia a piretroides (Flores et al. 2005).

Las oxidasas de función múltiple solamente se observaron sobreexpresadas en Progreso, Hochtun, Agua dulce y José Cardel y se encontraron entre el 69-95% de los

especímenes analizados. Estas enzimas a menudo han sido involucradas en la resistencia a los piretroides (Polson et al. 2011). Sin embargo, contrario a los hallazgos de Son et al. (2018), quienes informaron un aumento en los niveles de MFO en respuesta a la selección de deltametrina, descubrimos que la actividad de MFO disminuyó con la selección sucesiva.

## **8.4 RNA-seq**

### **8.4.1 Función biológica de los genes diferencialmente expresados**

Diversos estudios han demostrado que la presión de selección ejercida por la exposición a insecticidas puede producir cambios en los niveles de expresión del transcriptoma de mosquitos (Bonizzoni et al., 2015; Campbell et al., 2019), de manera general la exposición a cualquier agente externo (xenobiótico), puede producir estos cambios tal como lo demuestran Zhao et al., (2010), en un experimento donde expusieron larvas de *Culex quinquefasciatus* a una concentración conocida de magnesio, los genes sobre y subexpresados incluyen citocromo b5 y tropomiosina-1, también obtenidos en nuestros resultados. Dichos cambios en la expresión pueden conducir al desarrollo de resistencia, la cual puede deberse a modificaciones estructurales en las proteínas-mutaciones (resistencia por el sitio de destino), incremento en la biodegradación del insecticida (resistencia metabólica), transporte alterado u otros grupos funcionales (David et al., 2014; Campbell et al., 2019).

### **8.4.2 Genes de digestion**

El 9.09% de los genes DE correspondieron a genes de digestión, después de la selección con deltametrina, mucinas principalmente. Las mucinas son similares a proteínas glicosiladas en las secreciones mucosas de los vertebrados, estas se encuentran en la matriz peritrófica en insectos, cuya función es similar a la de la mucosa de los vertebrados (Klowden, 2013), en larvas *Plutella xilostella* se han encontrado más de 18 mucinas en la MP del intestino medio (Sarauer et al., 2003). Por lo tanto, AAEL013367 (Mucin-2), podría jugar un rol importante en el recubrimiento intestinal y digestión.

#### **8.4.3 Genes de función Redox y mitocondrial**

Un conjunto de genes DE en las poblaciones de campo (F0), AAEL018658 (NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 2), AAEL018662 (Cytochrome c oxidase subunit I), AAEL018668 (ATP synthase F0 subunit 6), AAEL018669 (Cytochrome c oxidase subunit III), AAEL018680 (NADH dehydrogenase subunit 4), AAEL018681 (NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 4L) AAEL018684 (NADH dehydrogenase subunit 6), AAEL018685 Cytochrome b, AAEL018687 (NADH dehydrogenase subunit 1), relacionados a actividad redox y estrés mitocondrial fueron agrupados en una misma categoría (RSM), genes de función mitocondrial también han sido vinculados a la resistencia a permetrina en mosquitos anophelinos (Otalí et al., 2014) y *Aedes aegypti* (Zhao., 2009).

El gen AAEL018662 (Cytochrome c oxidase subunit I) se encontró sobreexpresado en túbulos de Malpighi de mosquitos *Aedes aegypti* tanto en estado larvario como en estado adulto (Li et al., 2017). Los túbulos de Malpighi están constituidos de tejido excretor clave en mosquitos, dentro de sus funciones principales se encuentran el balance osmótico y la eliminación de desechos como xenobióticos y el exceso de nitrógeno (Beyenbach y Piermarini, 2011), son análogos de los riñones en vertebrados, y son el tejido excretor primario en insectos (Klowden, 2013), por lo que este gen podría jugar un rol importante en la diuresis y excreción. AAEL018669 (cytochrome C subunit III) ha reportado subexpresado en estudios previos con mosquitos infectados con virus DEN, sin embargo, no es claro si la disminución en la expresión beneficia la replicación viral o la defensa del huésped (Koh et al., 2018).

#### **8.4.4 Genes de reproducción**

La cáscara de huevo o corion en insectos tiene extraordinarias propiedades mecánicas y fisiológicas en la protección del oocito y desarrollo embrionario a una serie de riesgos ambientales como tóxicos, variaciones en la temperatura, presión mecánica, ataque de proteasas, infecciones bacterianas y virales (Yao y Li, 2003). Está elaborada por diferentes tipos de proteínas, estructurales, enzimas, y proteínas no caracterizadas o de función desconocida (Isoe et al., 2019). AAEL007641-Coiled-coil domain-containing protein lobo (LOC5569456) podría estar implicado en reticulación proteica de la formación de la cáscara del huevo de *Aedes aegypti*. La cáscara de huevo o corion es un complejo

conformado por varias capas intercaladas, que actúa como barrera protectora por dos vías, una evitando la pérdida o daño de contenido interno de huevo, así como, la perturbación del mismo por el medio externo o las adversidades ambientales (Klowden, 2013). Los huevos de *Aedes aegypti* son capaces de resistir a largos periodos de desecación, detectar proteínas capaces de hacer menos resistentes o intolerantes a la desecación sería beneficioso desde el punto de vista de control de vectores (Marinotti et al., 2014). La identificación de estas proteínas sería potencial para el desarrollo de nuevos productos insecticidas dirigidos a la reproducción de mosquitos (Isoe et al., 2019).

En *Ae. aegypti*, el gen Actin-4 (AAEL001951) es un gen ortólogo regulador de la compensación de dosis génica que tiene dos isoformas debido a su especialización específica del sexo (Jiang et al., 2015): la isoforma femenina, que está altamente expresada, y la isoforma masculina, que se expresa en un nivel más bajo. Este gen se encontró sobreexpresado en poblaciones de la generación basal y después de selección con deltametrina.

#### **8.4.5 Genes de función proteosomal**

El gen AAEL009108 (Proteasa M1 zinc metallopeptidasa) está involucrado en una variedad de procesos fisiológicamente importantes como el procesamiento de proteínas y recambio, regulación de la acción de la hormona peptídica, infección viral, invasión de tejidos y control del ciclo celular (Pardo, 2006). Zou et al., (2016) confirmó resistencia a deltametrina en poblaciones de *Culex pipiens pallens* mediada por esta enzima tanto en poblaciones susceptibles como resistentes, la presencia de dicho gen no solo disminuyó la sensibilidad a deltametrina, sino también incrementó la expresión de CYP6CP1 sugiriendo su relación en la regulación de genes P450, por lo que este gen podría mediar resistencia a deltametrina en poblaciones de *Aedes aegypti*.

AAEL003012 (Matrix Metallopeptidase MMP) se encontró sobreexpresado en mosquitos infectados con virus de Oeste del Nilo (Fukutani et al., 2018), sin embargo, un estudio previo señala subexpresión en mosquitos con infección a tres virus, oeste del Nilo, dengue y fiebre amarilla, por lo tanto, juega un rol importante en la infección con virus (Colpitts et al., 2011).

#### 8.4.6 Genes cuticulares

El 16.7% de los genes correspondió a genes de cutícula. Trabajos previos han reportado que la temperatura es un factor determinante en la expresión del gen AAEL003049 (Pupal cuticle protein 78E) por lo tanto puede contribuir a la supervivencia del mosquito adulto (Hugo, 2014). Paris et al., (2012) encontró subexpresado este gen en poblaciones de mosquitos *Ae. egypti* resistentes a la toxina Bti.

El gen Chitin synthase (AAEL002718) tiene vital importancia en el crecimiento de insectos y morfogénesis de las estructuras que contienen quitina (Merzendorfer y Zimoch, 2003). Esta enzima participa en el último paso de la síntesis de quitina y es regulada por la hormona 20-hydroxyecdysone (20E) (Klowden, 2013).

Nuestros resultados señalan la sobreexpresión del gen AAEL013766 (Obstructor E) en mosquitos de la generación basal y después de la selección con deltametrina. Obstructor E es una proteína constituyente de la cutícula que confiere contractibilidad y expandibilidad, ha sido ampliamente estudiada en *Drosophila melanogaster*, en ausencia de Obst-E la larva no puede experimentar la metamorfosis, tal como señala Tajiri et al., (2017), sus resultados señalan que Obst- E regula la disposición de quitina, polisacárido de cadena larga y constituyente importante de la cutícula del insecto, el cual dirige la formación de supracelular, formación de crestas en la cutícula, en ausencia de obstructor E se observan cambios en la morfología de estas crestas. Por lo tanto, Obst-E afecta directamente la forma física del exoesqueleto del insecto. Existen estudios que demuestran que los mosquitos resistentes sellan sus patas con cantidades de hidrocarburos relativamente más altos en comparación con los susceptibles, dichas alteraciones estructurales se asocian con una absorción reducida de insecticidas contribuyendo a la resistencia (Balabanidou et al., 2019). Es probable que los genes de cutícula DE, jueguen un rol importante en la resistencia a deltametrina al contribuir a la formación de una cutícula más elaborada como consecuencia del modo acción de dicho piretroide, sin embargo, se requieren estudios más finos de análisis de la morfología y composición cuticular para observar la asociación directa de estos genes DE en la resistencia cuticular a insecticidas.

En general las quitinasas, actúan protegiendo al insecto contra otros organismos que contienen quitina, controlan el crecimiento y la muda del organismo y reducen la penetración de la cutícula (Lee et al., 2011). La expresión diferencial de AAEL004897

(Brain chitinase) se ha relacionado a la probable resistencia a permetrina e infección por virus Zika (Martínez-Sobrido y almazan, 2019). AAEL004292 y AAEL013515 (pupal cuticle protein, putative) tienen función en la formación de la cutícula (Cosme, 2015).

#### **8.4.7 Genes de transporte**

Estudios previos de secuenciación del transcriptoma de *Culex pipiens pallens* ha reportado diferentes niveles de expresión del gen Venom Allergen 5 en hembras de laboratorio y campo, resistentes a deltametrina, en estudios de RNAi la sobreexpresión de dicho gen redujo significativamente la susceptibilidad de las células de mosquito a deltametrina, por lo tanto este gen tiene una asociación directa con la resistencia a deltametrina en poblaciones de mosquitos (Yuan et al., 2015), tal como observamos en nuestros resultados después de la selección con deltametrina. Un estudio reciente con poblaciones de *Aedes aegypti* genes de *Venom allergen* también sido clasificados como genes de inmunidad por Zhao et al., (2019) realizaron un análisis de secuenciación de ARN para comparar transcriptomas de dos cepas de *Aedes aegypti* en respuesta a la infección por el virus chikungunya.



## 9. CONCLUSIONES

Todas las poblaciones fueron resistentes a deltametrina con valores  $RRCK_{50}$  entre 4-20X y  $RRCL_{50}$  entre 6-136X en la  $F_{S0}$ , incrementando 1-6 veces en la  $F_{S5}$ . La respuesta a la selección con deltametrina aumentó al menos 2 veces, lo que significa, el doble del ingrediente activo para proporcionar un 50% de mortalidad o derribo después de la selección de deltametrina.

La selección de la resistencia a la deltametrina fue rápida con valores  $h^2$  entre 0.779-0.948) para la  $CL_{50}$  y  $CK_{50}$  considerando todos los mecanismos involucrados a la resistencia. Mérida y Hochtun mostraron los valores más altos ( $h^2 > 0.7$ ) para el parámetro  $LC_{50}$  y Progreso para el parámetro  $KC_{50}$ .

Los altos niveles de resistencia y su asociación con las altas frecuencias de mutaciones *kdr* (V410L, V1, 016I y F1, 534C) obtenidas en la selección artificial, sugieren un rol importante de estas mutaciones en la resistencia a deltametrina.

La actividad media enzimática fue subexpresada por la selección con deltametrina, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en la expresión de genes.

Estos hallazgos también ponen en manifiesto la necesidad de monitorear el estado de susceptibilidad de las poblaciones de mosquitos antes de implementar cualquier producto insecticida como una medida de control, así como la rotación de los mismos, sobre todo en zonas donde ya se ha reportado resistencia en las poblaciones de mosquitos.

Cinco de las 12 categorías de función biológica de los genes presentes en la generación  $F_{S0}$ , fueron diferencialmente expresados después de la selección con deltametrina, el mayor número de genes D.E. fueron los genes de cutícula ( $|FC| > 2.0$  &  $Adj.P < 0.05$ ), por lo que su contribución con la resistencia a deltametrina no puede ser descartada.

Es preciso profundizar en el análisis de la morfología y composición cuticular en *Aedes aegypti* para observar la asociación directa de estos genes DE en la resistencia cuticular a insecticidas.

## 10. BIBLIOGRAFIA

Abbas A, Abbas RZ, Khan JA, Iqbal Z, Bhatti MMH, Sindhu ZuD, Zia MA. 2014. Integrated strategies for the control and prevention of dengue vectors with particular reference to *Aedes aegypti*. *Pakistan Veterinary Journal* 34: 1-10.

Abbott WS. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal Economic Entomology* 18: 265–267.

Agresti A, Coull BA. 1998. Appoximate is better than “exact” for interval estimation of binominal proportions. *American Statistician* 52: 119-126.

Álvarez L, Ponce G, Saavedra-Rodriguez K, Lopez B, Flores A. 2015. Frequency of V1016I and F1534C mutations in the voltage-gated sodium channel gene in *Aedes aegypti* in Venezuela. *Pest Management Science* 71: 863–869.

Amelia-Yap ZH, Chen CD, Sofian-Azirun M, Low VL. 2018. Pyrethroid resistance in the dengue vector *Aedes aegypti* in Southeast Asia: present situation and prospects for management. *Parasit. Vectors* 11: 332.

Andersen, J. F., Utermohlen, J. G., & Feyereisen, R. (1994). Expression of housefly CYP6A1 and NADPH-cytochrome P450 reductase in *Escherichia coli* and reconstitution of an insecticide-metabolizing P450 system. *Biochemistry*,33(8), 2171-2177.

Aponte H, Penilla P, Dzul-Manzanilla F, Che-Mendoza, A, López, A, Solís, F, Manrique-Saide, P, Ranson, H, Lenhart, A, McCall P, Rodríguez A. 2013. The pyrethroid resistance status and mechanisms in *Aedes aegypti* from the Guerrero state, Mexico. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 107: 226-234.

Balabanidou V, Vasileia B, Mary K, Michalis A, Venetia K, Juan R, Sergio J, Patricia J, Eva P, George C, Anastasia, K, Christoforos N, Hilary R, John V. 2019. Mosquitoes cloak

their legs to resist insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 286: e20191091.

BBSRC. The history of the pyrethroid insecticides disponible en: <https://bbsrc.ukri.org/research/impact/pyrethroids/>.

Becker N, Petric D, Zgomba M, Boase C, Madon M, Dahl C, Kaiser A. 2010. Mosquitoes and their control. Springer Heidelberg Dordrecht London. New York, pp 441-475.

Beyenbach K, Piermarini P. 2011. Transcellular and Paracellular Pathways of Transepithelial Fluid Secretion in Malpighian (renal) Tubules of the Yellow Fever Mosquito *Aedes aegypti*. *Acta Physiol (Oxf)* 202: 387-407.

Bisset JA. 2002. Uso correcto de insecticidas: control de la Resistencia. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 54:202-219.

Bolger M, Marc L, Bjoern U. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30: 2114–2120.

Bonizzoni M, Ochomo E, Dunn WA, Britton M, Afrane Y, Zhou G, Hartsel J, Lee MC, Xu J, Githeko A, Fass J, Yang G. 2015. RNA-seq analyses of changes in the *Anopheles gambiae* transcriptome associated with resistance to pyrethroids in Kenya: Identification of candidate-resistance genes and candidate-resistance SNPs. *Parasites & Vectors* 8:474. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1083-z>

Boyer S, David JP, Rey D, Lemperiere G, Ravanel P. 2006. Response of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae to three xenobiotic exposures: larval tolerance and detoxifying enzyme activities. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25: 470–476.

Brogdon W. G., Beach R. F., Stewart J. M. and Castanaza L. (1988a). Microplate assay analysis of the distribution of organophosphate and carbamate resistance in Guatemalan *Anopheles albimanus*. *Bull. WHO* 66, 339.

Brogdon W. G., Hobbs J. H., St Jean Y., Jacques J. R. and Charles L. B. (1988b). Microplate assay analysis of reduced fenitrothion susceptibility in Haitian *Anopheles albimanus*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 4, 152-8.

Brogdon WG, McAllister JC, Vulule J. 1997. Heme peroxidase activity measured in single mosquitoes identifies individuals expressing an elevated oxidase for insecticide resistance. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 13: 233-7.

Brogdon WG, McAllister JC. 1998a. Insecticide Resistance and Vector Control. *Emerging Infectious Diseases* 4:605-613.

Brogdon WG, McAllister JC. 1998b. Simplification of adult mosquito bioassays through use of time-mortality determinations in glass bottles. *Journal of the American Mosquito Control Association* 14:159-164.

Brown AW. 1958. Insecticide resistance in arthropods. World Health Organization. Monograph Series 38:40.

Campbell C, Saavedra-Rodríguez k, Cubik T, Lenhart A, Lozano-Fuentes, Black WC, IV. 2019. Vgsc-interacting proteins are genetically associated with pyrethroid resistance in *Aedes aegypti*. *PLoS ONE* 14: e0211497.

Casida JE, Quistad GB. 1998. Golden age of insecticide research: Past, present, or future?. *Annual Review of Entomology* 43:1-16.

CENAPRECE-SSA. Lista de productos recomendados por el CENAPRECE para el combate de insectos vectores de enfermedades a partir de 2019. México, D.F. [En línea] Disponible en: [www.salud.gob.mx](http://www.salud.gob.mx) [Consulta 18 de agosto de 2019].

Che A, Contreras Y, Uc V, Guillermo G, Lenhart A, McCall P. 2014. Susceptibility of *Aedes aegypti* from Acapulco and Mérida to insecticides employed for vector control in

México. In: Clark GG, Fernández-Salas I (eds) Mosquito vector biology and control in Latin America a 24th symposium, Seattle, WA, February 2014.

Chung H, Sztal T, Pasricha S, Sridhar M, Batterham P, Daborn PJ. 2009. Characterization of *Drosophila melanogaster* cytochrome P450 genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 5731–5736.

Coen E, Strachan T, Dover G. 1982. Dynamics of Concerted Evolution of Ribosomal DNA and Histone Gene Families in the *melanogaster* Species Subgroup of *Drosophila*. Department of Genetics, University of Cambridge. *Journal Molecular Biology* 158:17-35.

Coleman M, Hemingway J. 2007. Insecticide resistance monitoring and evaluation in disease transmitting mosquitoes. *Journal of Pesticide Science* 32:69-76.

Colpitts T, Cox J, Vanlandingham D, Feitosa FM, Cheng G, Kurscheid S, Wang P, Krishnan M, Higgs S, Fikri E. 2011. Alterations in the *Aedes aegypti* Transcriptome during Infection with West Nile, Dengue and Yellow Fever Viruses. *PLoS Pathog* 7:1-13.

Cosme L. 2015. Gene and miR Expression in the Yellow Fever Mosquito *Aedes aegypti*. Doctoral dissertation, Texas A & M University.

David JP, Coissac E, Melodelima C, Poupardin R, Riaz MA, Chandor A, Reynaud S. 2010. Transcriptome response to pollutants and insecticides in the dengue vector *Aedes aegypti* using next-generation sequencing technology. *BMC Genomics* 11: 216.

David JP, Faucon F, Chandor A, Poupardin R, Riaz M, Bonin A, Navratil V, Reynaud S. 2014. Comparative analysis of response to selection with three insecticides in the dengue mosquito *Aedes aegypti* using mRNA sequencing. *BMC genomics* 15:174.

Davies TG, Field LM, Usherwood PN, Williamson MS. 2007. DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. *IUBMB Life*. 59:151-162.

Deming R, Manrique-Saide P, Barreiro AM, Cardeña EU, Che-Mendoza A, Jones B. 2016. Spatial variation of insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti* presents unique vector control challenges. *Parasites & Vectors* 9:67.

Ding Y, Ortelli F, Rossiter LC, Hemingway J, Ranson H. 2003. The *Anopheles gambiae* glutathione transferase supergene family: annotation, phylogeny and expression profiles. *BMC genomics* 4: 1.

DOF (Diario Oficial de la Federación). 2003. NOM-032-SSA-2-2002 para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de enfermedades transmitidas por vectores. México.

DOF. 2011. NORMA Oficial Mexicana: NOM-032-SSA2-2010, Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vector. México, D. F. [En línea] Disponible: <http://www.cenaprece.salud.gob.mx/>

Elliott M.1976. Properties and Applications of Pyrethroids. *Environmental Health Perspectives*.

Enyati AA, Ranson H, Hemingway J. 2005. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Molecular Biology* 14: 3-8.

Falconer DS.1989. Introduction to Quantitative Genetics, 3rd edn. Longmans Green/John Wiley & Sons, Harlow, Essex, UK/New York.

Feyereisen R. 2005. Insect cytochrome P450. In: Gilbert, L.I, Latrou, K, Gill, S.S. (Eds.), *Comprehensive Molecular Insect Science*. Elsevier, Oxford, pp. 1–77.

Finney JD. 1971. Probit Analysis. Cambridge University Press. London 3ra ed., p 702.

Flores AE, Abeldaño W, Fernández I, Badii MH, Loaiza H, Ponce G. 2005. Elevated  $\alpha$ -esterase levels associated with permethrin toleracnce in *Aedes aegypti* (L.) from Baja California, México. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 82: 66–78.

Flores AE, Grajales JS, Fernández I, Ponce G, Loaiza H, Lozano S. 2006. Mechanisms of insecticide resistance in field populations of *Aedes aegypti* (L.) from Quintana Roo, Southern México. *Journal of the American Mosquito Control Association* 22:672–677.

Flores AE, Reyes G, Fernández I, Sánchez FJ, Ponce G. 2009. Resistance to permethrin in *Aedes aegypti* (L.) in northern Mexico. *Southwestern Entomologist* 34: 167-17.

Flores AE, Ponce G, Silva BG, Gutierrez SM, Bobadilla C, Lopez B, Mercado R, Black WC. 2013. Wide spread cross resistance to pyrethroids in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) From Veracruz state México. *Journal of Economic Entomology* 106: 959-969.

Flores AE, Ponce G, Monroy B, Villanueva O, Rodriguez S, Arredondo-Jimenez J. 2016. Current Status of the Insecticide Resistance in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Mexico. In: Trdan SBT-IR. Rijeka, (Eds) InTech, pp. 6

Fukutani K, Kasprzykowski J, Paschoal A, Gomes M, Barral A, de Oliveira C, Ramos P, Queiroz A. 2018. Meta-Analysis of *Aedes aegypti* Expression Datasets: Comparing Virus Infection and Blood-Fed Transcriptomes to Identify Markers of Virus Presence. *Front Bioeng Biotechnol* 5:84.

Garcia-Luna SM, Weger-Lucarelli J, Rückert C, Murrieta RA, Young MC, Byas AD, Fauver JR, Perera R, Flores-Suarez AE, Ponce-Garcia G, Rodriguez, Ebel AD, Black WC 4th. 2018. Variation in competence for ZIKV transmission by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Mexico. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 12, Article e0006599.

Galili T, Alan O, Jonathan S, Carson S. 2018. Heatmaply: An R package for creating interactive cluster heatmaps for online publishing. *Bioinformatics* 34:1600–1602.

Giraldo-Calderon GI, Emrich SJ, MacCallumRM, Maslen G, Dialynas E, Topalis P. 2015. VectorBase: an updated bioinformatics resource for invertebrate vectors and other organisms related with human diseases. *Nucleic Acids Res.* 43(Database issue): D707–13. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1117> PMID: 25510499; PubMed Central PMCID: PMC4383932.

Gómez H, Ibáñez S. 1994. Las enfermedades virales en el trópico. Dengue. In: Enfermedades Tropicales en México. Diagnóstico, Tratamiento y Distribución Geográfica. Valdespino, J., Velasco, A., Escobar, A., Ibáñez-Bernal, S. and Magos, C. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica. pp. 88-91.

Guzman MG, Harris E. 2015. Dengue. Lancet 385: 453-465.

Haddi K. 2017. Detection of a new pyrethroid resistance mutation (V410L) in the sodium channel of *Aedes aegypti*: a potential challenge for mosquito control Scientific Reports 7: e46549. <https://doi.org/10.1038/srep46549>.

Hall B. 2017. The Emergence of Zika Virus: The Heron 2017, 1st Edn, Vol. 7. Available at: [http://greatbay.edu/sites/default/files/media/The-Heron-Vol7\\_2017.pdf#page=20](http://greatbay.edu/sites/default/files/media/The-Heron-Vol7_2017.pdf#page=20)

Hemingway J, Georgiou GP. 1983. Studies on the acetylcholinesterase of *Anopheles albimanus* resistant and susceptible to organophosphate and carbamate insecticides. Pesticide biochemistry and physiology, 19 (2), 167-171.

Hemingway J, Ranson H. 2000. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. Annual Review of Entomology 45: 371–391.

Hemingway J. 1998. Techniques to detect insecticide resistance mechanisms (field and laboratory manual) WHO/CDC/CPC/MAL/98.6. World Health Organization, Geneva.

Hemingway J, Hawkes NJ, McCarroll L, Ranson H. 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. Insect Biochemistry and Molecular Biology 34: 653-655.

Hemingway J, Karunaratne SH. 1998. Mosquito carboxylesterases: a review of the molecular biology and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism. Medical and veterinary entomology: 12: 1-12.



Hugo L, Jeffery J, Trewin B, Wockner L, Nguyen T, Nghia I, Hine E, Ryan P, Kay B. 2014. Adult Survivorship of the Dengue Mosquito *Aedes aegypti* Varies Seasonally in Central Vietnam. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8: e2669.

INEGI. 2012a. Perspectiva estadística Veracruz de Ignacio de la llave diciembre 2012. In: [http://www.inegi.org.mx/prod\\_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/integracion/estd\\_perspect/ver/Pers-ver.pdf](http://www.inegi.org.mx/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/integracion/estd_perspect/ver/Pers-ver.pdf).

INEGI. 2012b. Perspectiva estadística de Yucatán marzo 2012. In: [http://www.inegi.org.mx/prod\\_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/integracion/estados/persc\\_estd/yuc/Persyuc.pdf](http://www.inegi.org.mx/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/integracion/estados/persc_estd/yuc/Persyuc.pdf)[http://www.inegi.org.mx/prod\\_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/integracion/estd\\_perspect/ver/Pers-ver.pdf](http://www.inegi.org.mx/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/integracion/estd_perspect/ver/Pers-ver.pdf)

Isoe J, Koch L, Isoe Y, Rasco A, Brown H, Massani B. 2019. Identification and characterization of a mosquito-specific eggshell organizing factor in *Aedes aegypti* mosquitoes. *PLoS Biology* 17: e3000068 <https://doi.org/10.1371>.

Jensenius M, Han PV, Schlagenhauf P, Schwartz E, Parola PH, Castelli F. 2013. Acute and potentially life-threatening tropical diseases in western travelers—A GeoSentinel multicenter study. *American Journal of Tropical Medicine Hygiene* 88: 397–404.

Jiang X, James Biedler K, Yumin Q, Andrew B, Zhijian T. 2015. Complete Dosage Compensation in *Anopheles stephensi* and the Evolution of Sex-Biased Genes in Mosquitoes. *Genome Biology and Evolution* 7: 1914–1924.

Kandel Y, Vulcan J, Rodriguez SD, Moore E, Chung HN, Mitra S. 2019. Widespread insecticide resistance in *Aedes aegypti* L. from New Mexico, U.S.A. *PLoS ONE* 14: e0212693. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212693>.

Kawada H, Higa Y, Komagata O, Kasai S, Tomita T, Nguyen TY. 2009. Widespread distribution of a newly found point mutation in voltage-gated sodium channel in pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* populations in Vietnam. *Plos Neglected Tropical Diseases* 3: 527–534.

Klaus W, Peter M. 2011. Transcellular and Paracellular Pathways of Transepithelial Fluid Secretion in Malpighian (renal) Tubules of the Yellow Fever Mosquito *Aedes aegypti*. *Acta Physiologica* 202: 387–407.

Klowden M. 2013. Physiological systems in insects. London Academic Press. Liao, C., Upadhyay, A., Liang, J., Han, Q. and Li, J. 2018 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde synthase and the formation of the cuticle of insects. *Developmental & Comparative Immunology* 83: 44-50.

Koh C, Allen S, Herbert R., McGraw A, Chenoweth S. 2018. The Transcriptional Response of *Aedes aegypti* with Variable Extrinsic Incubation Periods for Dengue Virus. *Genome Biology Evolution* 10: 3141–3151.

Lampman RL, Kim CH, Muturi EJ. 2014. The Importance of Oxidases in the Tolerance of Deciduous Leaf Infusions by *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* and *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology* 51: 68-75.

Law C, Alhamdoosh M, Su S, Dong X, Tian L, Smyth G, Ritchie M. 2018. RNA-seq analysis is easy as 1-2-3 with limma, Glimma and edgeR [version 3; peer review: 3 approved]. *F1000Research* 5:1408.

Lee C, Da Silva C, De la Cruz C. 2011. Role of chitin and chitinase/chitinase-like proteins in inflammation, tissue remodeling, and injury. *Annual Review of Physiology* 73: 479–501.

Li Y, Piermarini P, Esquivel C, Drumm H, Schilkey F, Hansen I. 2017. RNA-Seq Comparison of Larval and Adult Malpighian Tubules of the Yellow Fever Mosquito *Aedes aegypti* Reveals Life Stage-Specific Changes in Renal Function. *Frontiers in Physiology* 8: 283.

Liao C, Upadhyay A, Liang J, Han Q, Li J. 2018. 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyde synthase and cuticle formation in insects. *Developmental and Comparative Immunology* 83: 44-50.

Linss JGB, Brito L P, Garcia GA, Araki AS, Bruno RV, Pereira JB, Martins AJ. 2014. Distribution and dissemination of the Val1016Ile and Phe1534Cys Kdr mutations in *Aedes aegypti* Brazilian natural populations. *Parasites & Vectors* 7: 25.

Liu N. 2015. Insecticide Resistance in Mosquitoes: Impact, Mechanisms, and Research Directions. *Annual Review of Entomology*. 60:537–59.

López B, Ponce G, González J, Gutiérrez S, Villanueva O, González G. 2014. Susceptibility to clorpirifos in pyrethroid-resistant populations of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from México. *Journal of medical entomology* 51:644-649.

López-Monroy B, Gutierrez-Rodriguez SM, Villanueva-Segura OK, Ponce-Garcia G, Morales-Forcada F, Alvarez LC, Flores AE. 2018. Frequency and intensity of pyrethroid resistance through the CDC bottle bioassay and their association with the frequency of kdr mutations in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Mexico. *Pest Management Science* doi: 10.1002/ps.4916.

Lozano FS, Saavedra RK, Black IV W, Eisen L. 2012. QCAL: A software application for the calculation of dose-response curves in insecticide resistance bioassays. *Journal of the American Mosquito Control Association* 28:59-91.

Lumjuan N, Rajatileka S, Shangsom D, Wicheer J, Leelapat P, Prapanthadara L. 2011. The role of the *Aedes aegypti* Epsilon glutathione transferases in conferring resistance to DDT and pyrethroid insecticides. *Insect Biochemistry and molecular biology* 41: 203-209.

Lumjuan N. Wicheer J, Leelapat P, Choochote W, Somboom P. 2014. Identification and Characterisation of *Aedes aegypti* Aldehyde Dehydrogenases Involved in Pyrethroid Metabolism. *PLOS ONE* 9: e102746.

Maestre-Serrano R, Pareja-Loaiza P, Gomez D, Ponce.García G, Flores A. 2019. Co-occurrence of V1016I and F1534C mutations in the voltage-gated sodiumchannel and

resistance to pyrethroids in *Aedes aegypti* (L.) from the Colombian Caribbean region. *Pest Manag Sci* 75 :1681-1688. doi: 10.1002/ps.5287

Mackenzie L, Weedall G, Lol J, Pinto J, Vizcaino L, Dzuris N, Riveron J, Padilla N, Wondji C, Lenhart A. 2019. Contrasting patterns of gene expression indicate differing pyrethroid resistance mechanisms across the range of the New World malaria vector *Anopheles albimanus*. *PLoS ONE* 14: e0210586.

Marcombe S, Poupardin R, Darriet F, Reynaud S, Bonnet J, Strode C. 2009. Exploring the molecular basis of insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti*: case study in Martinique Island (French West Indies). *BMC Genomics* 10: 494-508.

Marcos-Marcos J, Olry de Labry-Lima A2, Toro-Cardenas S, Lacasaña M, Degroote S, Ridde V, Bermudez-Tamayo C. 2018. Impact, economic evaluation, and sustainability of integrated vector management in urban settings to prevent vector-borne diseases: a scoping review. *Infect Dis Poverty*. 7:83. doi: 10.1186/s40249-018-0464-x.

Marinotti O, Ngo T, Kojin B. 2014. Integrated proteomic and transcriptomic analysis of the *Aedes aegypti* eggshell. *Developmental Biology* 14: 15.

Martínez D, Chandre F, Williamson MS, Darriet F, Berge JB, Devonshire AL, et al. 1998. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Molecular Biology* 7:179-184.

Martínez D, Devonshire AL, Williamson MS. 1997. Molecular Studies of Knockdown Resistance to Pyrethroids: Cloning of Domain II Sodium Channel Gene Sequences from Insects. *Pesticide Science* 51: 265-270.

Martinez-Sobrido, L. and Almazán F. 2019. New Advances on Zika Virus Research. *Viruses* 11:258.

Mazzarri M, Georghiou G. 1995. Characterization of resistance to organophosphate, carbamate, and pyrethroid insecticides in field population of *Aedes aegypti* from Venezuela. *Journal of the American Mosquito Control Association* 11:315-322.

McCaffery A, Nauen R. 2006. The Insecticide Resistance Action Committee (IRAC): public responsibility and enlightened industrial self-interest. *Pest Management Science* 17:11–14.

Merzendorfer H, Zimoch L. 2003. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *Journal of Experimental Biology* 206: 4393–4412.

Ministério da Saúde, Fundação OC. 2006. Metodologia para qualificação de atividades de enzimas relacionados com a resistência a inseticidas em *aedes aegypti*/ Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz = Quantification methodology for enzyme activity related to insecticide resistance in *aedes aegypti*/ Ministry of Health of Brazil, Fundação Oswaldo Cruz. – Brasília: 128 p.: il – (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

Montella I, Martins A, Fernández V, Pereira J, Braga I, Valle D. 2007. Insecticide Resistance Mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* populations from 2001 to 2004. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 77: 467-477.

Moyes C, Vontas J, Martins A, Ng L, Koou, Dusfour I. 2017. Contemporary status of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses infecting humans. *Plos Neglected Tropical Diseases* 11: e5625. 10.1371/journal.pntd.0005625.

Nauen R. 2007. Perspective Insecticide resistance in disease vectors of public health importance. *Pest Management Science* 63: 628-633.

Neuwirth E. 2014. RColorBrewer: ColorBrewer Palettes.

Nkya T, Akhouayri I, Kisinza W, David J. 2013. Impacto del ambiente sobre la respuesta del mosquito a los insecticidas piretroides: hechos, evidencias y perspectivas. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 43: 407-416.

Oakeshott JG, Claudianos C, Campbell PM, Newcomb RD Russell RJ. 2010. Biochemical Genetics and Genomics of Insect Esterases. in LI Gilbert, K Iatrou & SS Gill (eds), *Comprehensive Molecular Insect Science*. Elsevier, Netherlands, pp. 1 - 73.

Otali D, Novak R, Wan W, Bu S, Moellering D, De Luca M. 2014. Increased production of mitochondrial reactive oxygen species and reduced adult life span in an insecticide-resistant strain of *Anopheles gambiae*. *Bulletin of Entomological Research* 104: 323–333.

Oviedo M, VanEkeris L, Corena MDP, Linser PJ. 2008. A microarray-based analysis of transcriptional compartmentalization in the alimentary canal of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) larvae. *Insect Molecular Biology* 17: 61–72.

Pardo A, Selman M. 2006. Matrix metalloproteases in aberrant fibrotic tissue remodeling. *Proceedings of the American Thoracic Society* 3: 383–8.

Paris M, Melodelima C, Coissac E, Tetreau G, Reynaud S. 2012. Transcription profiling of resistance to Bti toxins in the mosquito *Aedes aegypti* using next-generation sequencing. *Journal of Invertebrate Pathology* 109: 201–208.

Philip CB, Rozenboom LE. 1973. Medico-veterinary entomology: a generation of progress. In: *History of Entomology*, Smith RF, Miller TE, Smith CN (eds). Palo Alto (CA): Annual Reviews Inc.

Plernsub J, Saingamsook J. 2016. “Additive effect of knockdown resistance mutations, S989P, V1016G and F1534C, in a heterozygous genotype conferring pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* in Thailand,” *Parasites & Vectors* 9: 417.

Polson KA, Brogdon WG, Rawlins SC, Chadee DD. 2011. Characterization of insecticide resistance in Trinidadian strains of *Aedes aegypti* mosquitoes. *Acta Tropica* 117: 31–38.

Ponce G, Flores A, Fernandez I, Saavedra-Rodriguez K, Reyes G, Lozano S, Bond G, Casas M, Ramsey G, Domínguez M, Ranson H, Hemingway J, Eisen L, Black W. 2009. Recent rapid rise of a permethrin *knock down* resistance allele in *Aedes aegypti* in México. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 3: 531–560.

Poupardin R, Riaz MA, Vontas J, David JP, Reynaud S. 2010. Transcription profiling of eleven cytochrome P450s potentially involved in xenobiotic metabolism in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Molecular Biology* 19: 185e193.

Poupardin R, Srisukontarat W, Yunta C, Ranson H. 2014. Identification of Carboxylesterase Genes Implicated in Temephos Resistance in the Dengue Vector *Aedes Aegypti*. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8: e2743.

Pratt HD, Moore CG. 1993. Mosquitoes of Public Health importance and their control. Self-study course 3013-G. Vector borne disease control. CDC. Atlanta, pp 22-23.

Prusty AK, Meena DK, Mohapatra S, Panikkar P, Das P, Gupta SK, Behera BK. 2015. Synthetic pyrethroids (Type II) and freshwater fish culture: Perils and mitigations. *Int Aquat Res* 7: 163-191.

Rajatileka S, Burhani J, Ranson H. 2011. Mosquito age and susceptibility to insecticides. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 105:247–253.

Ranson H, Prapanthadara, LA, Hemingwa YJ 1997. Cloning and characterization of two glutathione S-transferases from a DDT-resistant strain of *Anopheles gambiae*. *Biochemical Journal* 324: 97-102.

Ranson H, Claudianos, C, Ortellì F, Abgrall C, Hemingway J, Sharakhova MV, Unger MF, Collins FH, Feyereisen R. (2002). Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. *Science*, 2985591: 179-181.

Ray D, Fry J. 2006. A reassessment of the neurotoxicity of pyrethroid insecticides. *Pharmacology and Therapeutics* 111: 174-193.

Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, Smyth GK. 2015. limma powers differential expression analyses for {RNA}-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Research*, 43(7), e47.

Rivera R. 2014. Fiebre chikungunya en México: caso confirmado y apuntes para la respuesta epidemiológica. *Salud pública de México* 56: 402-404.

Riveron JM, Yunta C, Ibrahim SS., Djouaka R, Irving H, Menze BD, Ismail HM, Hemingway J, Ranson H, Albert A, Wondji CS. 2014. A single mutation in the GSTe2 gene allows tracking of metabolically based insecticide resistance in a major malaria vector. *Genome biology*, 15: R27.

Robinson MD, Davis J, Gordon K. 2010. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26: 139–140.

Rodríguez AD, Dzúl F, Penilla P, Che A, López AD, Solís F. 2010. Monitoreo de resistencia a insecticidas en *Aedes aegypti* de Acapulco, Guerrero, México. *Sociedad Mexicana de Entomología, A. C.* 9: 712-715.

Saavedra-Rodriguez K, Urdaneta-Marquez L, Rajatileka S, Moulton M, Flores A, Fernandez-Salas I, Bisset J, Rodriguez M, McCall P, Donnelly M, Ranson H, Hemingway J, Black W. 2007. Mutations in the voltage gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti*. *Insect Molecular Biology* 16: 785–798.



Saavedra-Rodríguez K, Ponce G, Fernández I, Torres R, Flores AE. 2008. Mutación asociada a insecticidas piretroides en el mosquito transmisor del dengue (*Aedes egypti*). *Ciencia UANL* 11: 393-402.

Saavedra- Rodríguez K, Flores AE, Fernández I, Strode C, Ranson H, Hemingway J, Black WC. 2012. Transcription of detoxification genes after permethrin selection in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Molecular Biology* 21: 61–77.

Saavedra-Rodríguez K, Strode C, Flores AE, García-Luna S, Reyes-Solis G, Ranson H, Hemingway J, Black WC. 2014. Differential transcription profiles in *Aedes aegypti* detoxification genes after temephos selection. *Insect Molecular Biology* 23: 199–215.

Saavedra-Rodríguez K, Beaty M, Lozano-Fuentes S, Denham S, García-Rejón J, Reyes-Solis G. 2015. Local Evolution of Pyrethroid Resistance Offsets Gene Flow among *Aedes aegypti* Collections in Yucatan State, Mexico. *American Journal Tropical Medicine and Hygiene* 92: 201–209.

Saavedra-Rodriguez K, Maloof FV, Campbell CL, Garcia-Rejon J, Lenhart A, Penilla P. 2018. Parallel evolution of *vgsc* mutations at domains IS6, IIS6 and IIIS6 in pyrethroid resistant *Aedes aegypti* from Mexico. *Scientific Reports*. 8: 67-47.

Sarauer BL, Gillott C, Hegedus D. 2003. Characterization of an intestinal mucin from the peritrophic matrix of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Insect Molecular Biology* 12:333–343.

Scott JG, Wen Z. 2001. Cytochromes P450 of insects: the tip of the iceberg. *Pest Management Science* 57:958-67.

Shepard DS, Coudeville L, Halasa YA, Zambrano B, Dayan GH. 2011. Economic impact of dengue illness in the Americas. *American Journal of Tropical Medicine Hygiene* 84: 200–07.

Siller Q, Ponce G, Lozano S, Flores AE. 2011. Update on the frequency of Ile1016 mutation in voltage gated sodium channel gene of *Aedes aegypti* in Mexico. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 27:357–362.

Soderlund DM. 2012 Molecular mechanisms of pyrethroid insecticide neurotoxicity: recent advances. *Archives of Toxicology* 86: 165–181.

Son-Un P, Choovattanapakorn N, Saingamsook J, Yanola J, Lumjuan N, Walton C, Somboon P. 2018. Effect of Relaxation of Deltamethrin Pressure on Metabolic Resistance in a Pyrethroid-Resistant *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Strain Harboring Fixed P989P and G1016G *kdr* Alleles. *Journal of Medical Entomology* 55:975-981.

SSA. 2008. Secretaría de Salud. Programa de Acción Específico 2007-2012 Dengue. México, D. F.

Stahl HC, Butenschoen VM, Tran HT, Gozzer E, Skewes R, Mahendradhata Y, Runge-Ranzinger S, Kroeger A, Farlow A. 2013. Cost of dengue outbreaks: literatura review and country case studies. *BMC Public Health* 13:1048.

Stevenson BJ, Pignatelli P, Nikou D, Paine MJ. 2012. Pinpointing P450s Associated with Pyrethroid Metabolism in the Dengue Vector, *Aedes aegypti*: Developing New Tools to Combat Insecticide Resistance. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 6: e1595.

Strode C, Wondji C, David JP, Hawkes NJ, Lumjuan N, Nelson DR, Drane D, Parakrama S, Hemingway J, Black W IV, Ranson H. 2008. Genomic analysis of detoxification genes in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 38: 113–123.

Strode C, Melo-Santos M, Magalhães T, Araujo A, Ayres C. 2012. Expression Profile of Genes during Resistance Reversal in a Temephos Selected Strain of the Dengue Vector, *Aedes aegypti*. *PLoS one* 7: e39 439.

Su S, Charity W, Casey A, Marie-Liesse A, Marnie E, Matthew E. 2017. Glimma: interactive graphics for gene expression analysis. *Bioinformatics* 33: 2050–2052.

Tabashnik BE. 1992. Resistance risk assessment: realized heritability of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae), tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae), and Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Economic Entomology* 85:1551–1559.

Tajiri R, Ogawa N, Fujiwara H, Kojima T. 2017. Mechanical Control of Whole Body Shape by a Single Cuticular Protein Obstructor-E in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genet* 13: e1006548.

Tang AH, Tu CP. 1994. Biochemical characterization of *Drosophila* glutathione -S-transferases D1 and D21. *Journal of Biological Chemistry*, 269: 27876-27884.

Taylor P, Radic Z. 1994. The cholinesterases: from genes to proteins. *Annual review of pharmacology and toxicology* 34: 281-320.

Valle D, Montella IR, Ribeiro RA, Viana-Medeiros PF, Martins-Júnior AJ, Lima JBP. 2006. Metodologia para quantificação de atividade de enzimas relacionadas com a resistência a inseticidas em *Aedes aegypti*/Quantification methodology for enzyme activity related to insecticide resistance in *Aedes aegypti*. Rio de Janeiro, Brasília: Fundação Oswaldo Cruz, Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde.

Valle D, Bellinato D, Viana-Medeiros P, Pereira JB, Martins A. 2019. Resistance to temephos and deltamethrin in *Aedes aegypti* from Brazil between 1985 and 2017. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 114: e180544.

Van Bortel W, Dorleans F, Rosine J, Bateau A, Rousseau D, Matheus S et al. 2014. Chikungunya outbreak in the Caribbean region and the significance for Europe. *Euro Surveillance* 19: 20759.

Vera-Maloof F, Saavedra-Rodriguez K, Elizondo-Quiroga A, Lozano-Fuentes S, Black W. 2015. Coevolution of the Ile1,016 and Cys1,534 Mutations in the Voltage Gated Sodium Channel Gene of *Aedes aegypti* in Mexico. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 9: e0004263.

Villanueva-Segura OK, Ontiveros-Zapata K, López-Monroy B, Ponce-Garcia G, Gutierrez-Rodríguez SM, Dávila-Barboza JA, Mora-Jasso E, Flores AE. 2019. Distribution and Frequency of the *kdr* Mutation V410L in Natural Populations of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) From Eastern and Southern Mexico. *Journal of Medical Entomology* :1-6.

Vogt RG, Riddiford LM, Prestwich GD. 1985. Kinetic properties of a sex pheromone-degrading enzyme: the sensillar esterase of *Antheraea polyphemus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 82: 8827-8831.

Vontas J, Small GJ, Hemingway J. 2001. Glutathione S-transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. *Biochem Journal* 357: 65–72. doi: <https://doi.org/10.1042/bj3570065>.

Vontas J, Blass C, Koutsos AC, David J-P, Kafatos FC, Louis C, Hemingway J, Christophides GK, Ranson H. 2005. Gene expression in insecticide resistant and susceptible *Anopheles gambiae* strains constitutively or after insecticide exposure. *Insect Molecular Biology* 14: 509.

Vontas J, David J-P, Nikou D, Hemingway J, Christophides GK, Louis C, Ranson H. 2007. Transcriptional analysis of insecticide resistance in *Anopheles stephensi* using cross-species microarray hybridization. *Insect Molecular Biology* 16:315-324.

Webb EC. 1992. *Enzyme Nomenclature 1992: Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes*. International Union of Biochemistry and Molecular Biology. Academic Press, San Diego, CA.

Wilkinson CF. 1976. Insecticide biochemistry and physiology. New York: Plenum Press, p. 768.

Wilson ME, Chen LH. 2015. Dengue: Update on Epidemiology. *Current Infectious Disease Reports* 17:457.

Wolanskay M, Harrill A. 2008. Toxicología neuroconductual de insecticidas piretroides en los animales adultos: una revisión crítica. *Neurotoxicología y teratología* 30: 55-78.

World Health Organization (WHO). Long-lasting insecticidal nets for malaria prevention—a manual for malaria programme managers. 2007. Trial Ed., WHO, Geneva. [http://www.who.int/malaria/publications/atoz/insecticidal\\_nets\\_malaria/en/](http://www.who.int/malaria/publications/atoz/insecticidal_nets_malaria/en/).

World Health Organization (WHO). Guidelines for procuring public health pesticides. World Health Organization. 2012. Available online [https://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241503426\\_pesticides/en/](https://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241503426_pesticides/en/)

World Health Organization (WHO). Global strategy for dengue prevention and control 2012-2020. 2012. Geneva. (documento WHO/HTM/NTD/VEM/2012.5).

World Health Organization. WHO recommended insecticides for space spraying against mosquitoes. Geneva, 5 February 2016. Available online from [http://who.int/entity/whopes/Space\\_Spray\\_products\\_February\\_2016.pdf](http://who.int/entity/whopes/Space_Spray_products_February_2016.pdf) (accessed 24 May 2016).

World Health Organization. WHOPES-recommended compounds and formulations for control of mosquito larvae. Geneva, 18 March 2016. Available online from [http://who.int/entity/whopes/Mosquito\\_larvicides\\_March\\_2016.pdf](http://who.int/entity/whopes/Mosquito_larvicides_March_2016.pdf) (accessed 24 May 2016).

World Health Organization & UNICEF/UNDP/World Bank/WHO. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. 2017. Global vector control response 2017-2030. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/259205>.

World Health Organization. WHO recommended insecticides for indoor residual spraying against malaria vectors. Geneva, 19 september 2018. Available online from [www.who.int › Insecticides\\_IRS\\_22\\_September\\_2018](http://www.who.int/Insecticides_IRS_22_September_2018)

Wood OR, Hanrahan S, Coetzee M, Koekemoer LL, Brooke BD. 2010. Cuticle thickening associated with pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles funestus*. *Parasites & Vectors* 3: 67.

Wright TRF. 1963. The genetics of an esterase in *Drosophila melanogaster* *Genetics* 48: 787-801.

Yang Y, Cheng JZ, Singhal SS, Saini M, Pandya U, Awasthi S, Awasthi YC. 2001. Role of glutathione S-transferases in protection against lipid peroxidation overexpression of HGSTA2-2 in K562 cells protects against hydrogen peroxide-induced apoptosis and inhibits JNK and caspase 3 activation. *Journal of Biological Chemistry* 276:19220-19230.

Yanola, J, Somboon P, Walton C, Nachaiwieng W, Prapanthadara L. 2010. A novel F1552/C1552 point mutation in the *Aedes aegypti* voltage-gated sodium channel gene associated with permethrin resistance. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 96: 127–131. doi:10.1016/j.pestbp.2009.10.005.

Yanola J, Somboon P, Walton C, Nachaiwieng W, Somwang P, Prapanthadara L. 2011. High-throughput assays for detection of the F1534C mutation in the voltagegated sodium channel gene in permethrin-resistant *Aedes aegypti* and the distribution of this mutation throughout Thailand. *Tropical Medicine and International Health* 16: 501.-509.

Yao R, Li J. 2003. Towards global analysis of mosquito chorion proteins through sequential extraction, two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. 2003. *Proteomics* 3: 2036- 2043.

Yu Q, Lu C., Li W, Xiang Z, Zhang Z. 2009. Annotation and expression of carboxylesterases in the silkworm, *Bombyx mori*. *BMC genomics* 10: 1.

Yuan L, Zhentao L, Shanchao H, Weijie W, Donghui Z, Dan Z, Yan S, Lei M, Bo S, Changliang Z. 2015. Venom allergen 5 is Associated with Deltamethrin Resistance in *Culex pipiens pallens* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology* 2: 672–682.

Zhao L, Pridgeon J, Becnel J, Clark G, Linthicum K. 2009. Mitochondrial gene cytochrome b developmental and environmental expression in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology* 46: 1361–1369.

Zhao L, James J, Gary G, Kenneth J, Linthicum J, Xixuan J. 2010. Identification and Expression Profile of Multiple Genes in Response to Magnesium Exposure in *Culex quinquefasciatus* Larvae. *Journal of Medical Entomology* 47: 1053–1061.

Zhao L, Alto B, Jiang Y, Yu F, Zhang Y. 2019. Transcriptomic Analysis of *Aedes aegypti* Innate Immune System in Response to Ingestion of Chikungunya Virus. *International Journal of Molecular Sciences*: 20: e3133.

Zou F, Guo Q, Sun Y, Zhou D, Hu M, Hu H, Liu B, Tian M, Liu X, Li X, Ma L, Shen B, Zhu C. 2016. Identification of protease m1 zinc metallo protease conferring resistance to deltamethrin by characterization of an AFLP marker in *Culex pipiens pallens*. *Parasites & Vectors* 9: 172.

Zyoud SH. 2016. Dengue research: a bibliometric analysis of worldwide and Arab publications during 1872–2015. *Virology Journal* 13: 78. doi:10.1186/s12985-016-0534-2

## 10. RESUMEN BIOGRÁFICO

Biol. Yamili Jazmín Contreras Perera

Candidata para el grado de

Dr. en ciencias con acentuación en Entomología Médica

Tesis: MECANISMOS DE RESISTENCIA Y PERFIL DE EXPRESION DE GENES INVOLUCRADOS EN LA RESISTENCIA A LA DELTAMETRINA EN POBLACIONES DE *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) EN MÉXICO

Campo de estudio: Entomología Médica

Datos personales: Nacida en Mérida, Yucatán, México el 8 de noviembre de 1985.

Educación: Egresada de la licenciatura en Biología, del Instituto Tecnológico de Conkal (ITC), Yuc, 2006-2011.

Experiencia profesional:

Tengo experiencia en manejo de insectarios, pruebas de eficacia biológica de insecticidas, así como monitoreo de resistencia en poblaciones de mosquitos. También he participado en la producción masiva de mosquitos *Aedes aegypti* silvestres e infectados con *Wolbachia*. He trabajado con taxonomía de insectos, biología y control de vectores, manejo técnicas moleculares como extracción de DNA, extracción de RNA, electroforesis en geles de agarosa, ensayos bioquímicos, ELISA, PCR punto final y tiempo real, RNA-seq.

También he tomado diferentes cursos y talleres, relacionados a la entomología médica, zoonosis y enfermedades emergentes, control y prevención de las enfermedades transmitidas por vector, así como riesgos biológicos en laboratorio.

He realizado diferentes estancias de investigación en instituciones como: el Instituto de Ecología A. C., trabajando directamente con la determinación taxonómica de ejemplares de la familia Culicidae. Realicé otra estancia de investigación en el Centro Regional de Investigación en Salud Pública (CRISP) del Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) durante el cual recibí capacitación en técnicas de colecta de vectores, así como la aplicación de insecticidas en viviendas. La última estancia la realice en el U.S. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) aplicando diferentes técnicas moleculares.

Dentro de mi experiencia también he impartido clases, pláticas, cursos y talleres. Así como la formación de recursos humanos a nivel licenciatura.